Казахский Национальный Университет имени Аль-Фараби

УДК: 615.277.3: 546.15 (043.3) На правах рукописи

АБЕКОВА АСИМА ОСПАНОВНА

Изучение противоопухолевой активности координационного соединения иода для разработки новых лекарственных средств

6D070100 - Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
Исламов Р.А. к.б.н.,
ассоциированный профессор,
заведующий лабораторией
доклинических исследований с
виварием, ТОО «Национальный
научный центр особо опасных
инфекций имени Масгута
Айкимбаева»

Зарубежный научный
консультант:
Нерсесян А.К., PhD, DSc,
профессор института
исследований рака, Медицинского
университета Вены, Австрия.

Республика Казахстан
Алматы, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ 4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ 5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 6
ВВЕДЕНИЕ 8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ 15
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15
1.1 Предпосылки и пробел в исследованиях 15
1.2 Современные стратегии противораковой терапии 17
1.3 Апоптоз как ключевая терапевтическая мишень при раке 22
1.4 Терапевтическое значение апоптоза 26
1.5 Роль АФК в противораковой терапии 27
1.6 Иод как биологически активный агент 29
1.7 Общая характеристика координационных соединений иода 34
1.8 Применение координационных соединений иода в фармации 37
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 43
2.1 Материалы исследования 43
2.2 Методы исследования 44
2.2.1 Квантовохимическое моделирование соединения *in silico* 44
2.2.2 Синтез иодсодержащего комплекса 45
2.2.3 Фармацевтические показатели качества КС-144 47
2.2.4 Методы культивирования клеток 50
2.2.5 Определение жизнеспособности клеток 51
2.2.6 Определение пролиферативной активности опухолевых клеток 51
2.2.7 Анализ цитотоксичности МТТ методом 52
2.2.8 Исследование проапоптогенной активности 52
2.2.9 Оценка апоптотической активности 53
2.2.10 Исследование колониеобразования опухолевых клеток 54
2.2.11 Влияние КС-144 на клеточный цикл 54
2.2.12 Исследование фрагментации ДНК методом TUNEL 55
2.2.13 Изучение мембранного потенциала митохондрий 56
2.2.14 Оценка уровня митохондриальных активных форм кислорода 57
2.2.15 Оценка образования активных форм кислорода и азота 57
2.2.16 Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro* 58
2.2.17 Вестерн-блоттинг 59
2.2.18 Субкультивирование микробиологических тест-штаммов 60
2.2.19 Реактивация микроорганизмов 61

2.2.20 Хранение тест-штаммов в условиях криоконсервации 62
2.2.21 Морфо-культуральные и физиолого-биохимические свойства 62
2.2.22 Оценка мутагенной активности в бактериальной тест-системе 63
2.2.23 Исследования на лабораторных животных 64
2.2.24 Изучение острой токсичности КС-144 на крысах 65
2.2.25 Предварительная оценка эффективности КС-144 *in vivo* 65
2.2.26 Статистические методы 67
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 69
3.1 *In silico* моделирование и синтез КС-144 69
3.2 Физико-химические свойства КС-144 72
3.2.1 УФ-видимая спектроскопия КС-144 73
3.3 Установление структуры КС-144 76
3.3.1 ИК-спектроскопия КС-144 76
3.3.2 Раман-спектроскопия КС-144 78
3.4 Стабильность координационного соединения иода 80
3.5 Оценка цитотоксической активности различных серий КС-144 83
3.6 Изучение цитотоксичности КС-144 на различных линиях опухолевых клеток 86
3.7 Комбинированное действие КС-144 с противоопухолевыми препаратами *in vitro* 89
3.8 Проапоптогенная и апоптотическая активность 92
3.9 Колониеобразование опухолевых линий клеток 94
3.10 Клеточный цикл опухолевых линий клеток 96
3.11 Фрагментация ДНК в опухолевых клетках методом TUNEL 97
3.12 Мембранный потенциал митохондрий раковых клеток 98
3.13 Оценка продукции митохондриального супероксида 100
3.14 Окислительная система раковых клеток 101
3.15 Экспрессия белковых маркеров методом вестерн-блоттинг 103
3.16 Мутагенная активность на клетках L5178Y ТК$^{+/-}$ clone (3.7.2C) 105
3.17 Генотоксичность КС-144 методом Эймса 109
3.18 Механизм противоопухолевого действия КС-144 114
3.19 Острая токсичность и противоопухолевая активность КС-144 *in vivo* 116
3.19.1 Изучение острой токсичности КС-144 116
3.19.2 Предварительная оценка эффективности КС-144 в комбинации с доксорубицином на модели карциномы яичников крыс 121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 126
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 131
ПРИЛОЖЕНИЯ 156

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие нормативные документы:

Кодекс Республики Казахстан от 7 июля 2020 года №360-VI «О здоровье народа и системе здравоохранения»

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020 «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств». Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 30 октября 2020 года № 21545.

Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик», зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 9 февраля 2021 года № 22167.

Приказ Министра торговли и интеграции Республики Казахстан от 17 июня 2021 года № 414-НҚ «Об утверждении Правил реализации принципов надлежащей лабораторной практики», зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 18 июня 2021 года № 23092.

Приказ Министра науки и высшего образования Республики Казахстан от 20 июля 2022 года № 2 «Об утверждении государственных общеобязательных стандартов высшего и послевузовского образования», зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 27 июля 2022 года № 28916.

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.32-2017. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 32644-2014. "Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности", Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, протокол от 28 марта 2014 г. № 65П

ICH Q1A(R2). Испытания стабильности новых лекарственных веществ и препаратов (Stability Testing of New Drug Substances and Products): гармонизированное руководство ICH. – Женева: International Council for Harmonisation, 2003.

ICH Q8(R2). Фармацевтическая разработка (Pharmaceutical Development): гармонизированное руководство ICH. – Женева: International Council for Harmonisation, 2009.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Апоптоз	−	программированная гибель клеток
Лекарственное средство	−	средство, представляющее собой или содержащее вещество, либо комбинацию веществ, вступающее в контакт с организмом человека, предназначенное для лечения, профилактики заболеваний человека или восстановления, коррекции или изменения его физиологических функций посредством фармакологического, иммунологического либо метаболического воздействия, или для диагностики заболеваний и состояния человека
Противоопухолевое действие	−	действие лекарственных средств, подавляющее рост раковых клеток в организме
Синергизм	−	вид взаимодействия лекарств, при котором эффект комбинации превышает эффекты каждого из веществ в отдельности
Токсичность	−	мера вредного воздействия исследуемого материала на биообъектах в условиях однократного или многократного введения
Фармацевтическая разработка	−	исследование для подтверждения того, что выбранная лекарственная форма, включая ее состав, технологию производства, методы контроля качества и упаковку отвечает своему назначению
Цитотоксичность	−	свойство физических воздействий химических веществ вызывать патологические изменения в клетках
in silico	−	исследования на основе компьютерных расчётов
in vitro	−	исследования вне живого организма (на культуре клеток)
in vivo	−	исследования на лабораторных животных

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АФК/ROS	–	активные формы кислорода / Reactive Oxygen Species
АфОЯ	–	аффинитетная опухоль яичника крыс
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислотá
ИК	–	инфракрасная спектроскопия
кл/яч	–	клеток на ячейку 96 луночного планшета
КС-144	–	координационное соединение иода под номером 144
КТ	–	комнатная температура
$ЛД_{50}$	–	средняя смертельная доза
МН	–	микроядра
МПД	–	максимально переносимая доза
МТТ-тест	–	3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид, колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток
НК	–	негативный контроль
НЦПП	–	Научный центр противоинфекционных препаратов
ОП	–	оптическая плотность
ПВП	–	комплекс иода с поливинилпирролидоном
ПЗ	–	перенос заряда
ПК	–	положительный контроль
ПКС	–	полная культуральная среда
p21	–	белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1А
p27	–	белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1В
СПЖ	–	средняя продолжительность жизни
УПЖ	–	увеличение продолжительности жизни
УФ	–	ультрафиолетовая спектроскопия
ФБС	–	фосфатно-солевой буфер
ФС	–	фармацевтическое средство
$ЦТК_{50}$	–	концентрация, приводящая к 50% гибели клеток
6-IL	–	6-Iodolactone / 6-иодолактон
Apo2L	–	Apoptosis Ligand 2 / лиганд индукции апоптоза 2
AKT	–	Protein Kinase B / протеинкиназа В
AIF	–	Apoptosis-Inducing Factor / фактор индукции апоптоза
ATCC	–	American Type Culture Collection / Американская коллекция типированных культур
BAD	–	Bcl-2-Associated Agonist of Cell Death / проапоптотический белок BAD
BAK		Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer / проапоптотический белок BAK
Bax	–	Bcl-2-associated X protein / проапоптотический белок Bax
Bcl-2	–	B-cell Lymphoma 2 / апоптоз ингибирующий белок В-клеточной лимфомы 2

Bcl-XL	–	B-cell Lymphoma-extra Large / апоптоз ингибирующий белок из семейства Bcl
BH3	–	BH3 миметики
CDK4	–	Cyclin-Dependent Kinase 4 / циклин-зависимая киназа 4
Cyclin D1	–	белок из семейства циклинов, специфически регулирующий фазовый переход G_1/S в клеточном цикле
MEK	–	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase / митоген-активируемая протеинкиназа-киназа
DR4	–	Death Receptor 4 / рецептор смерти 4
EZ4U	–	EZ4U Cell Proliferation Assay / тест для оценки клеточной пролиферации
FIC	–	Fractional Inhibitory Concentration / индекс дробной ингибирующей концентрации (индекс FIC)
GLP	–	Good Laboratory Practice / надлежащая лабораторная практика
I_2	–	молекулярный иод
NIS	–	Sodium/Iodide Symporter / натрий-иод симпортёр
NO	–	Nitric Oxide / оксид азота
p	–	Probability value / уровень статистической значимости (p-значение)
PARP	–	Poly(ADP-ribose) Polymerase / поли(АДФ-рибоза)-полимераза
PI	–	Propidium Iodide / флуоресцентный краситель пропидий иодид
Rh123	–	Rhodamine 123 / родамин 123
RPMI-1640	–	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 / питательная среда RPMI-1640
S9	–	S9 Metabolic activation system / система метаболической активации S9 (микросомальная фракция печени крыс)
SD	–	Standard Deviation / стандартное отклонение
SOD	–	Superoxide Dismutase / супероксиддисмутаза
TRAIL	–	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand / лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с фактором некроза опухоли
δ_s	–	симметричные деформационные колебания
λ	–	длина волны
ν	–	валентные колебания
ν_s	–	симметричные валентные колебания
ν_{as}	–	асимметричные валентные колебания
π	–	пи-орбиталь
π^*	–	пи-разрыхляющая орбиталь
σ	–	сигма-орбиталь
σ^*	–	сигма-разрыхляющая орбиталь
τ	–	внеплоскостные крутильные колебания
ω	–	веерные колебания

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. В диссертационной работе представлены результаты синтеза и изучения фармацевтических свойств, биологической и фармакологической активности нового координационного соединения иода с потенциальной противоопухолевой активностью. Диссертационное исследование включает изучение физико-химических свойств, эффективности и токсичности на различных моделях *in vitro* и *in vivo* нового координационного соединения иода - дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид (далее – КС-144). Полученное соединение КС-144 защищено национальным патентом (Приложение А), результаты были опубликованы в научных журналах (Приложение Б) и внедрены в практическую деятельность опытного производства АО «Научный Центр Противоинфекционных Препаратов», что подтверждается актом внедрения (Приложение В). Диссертационная работа выполнялась в рамках научно-технических программ 2015–2017 гг. и 2018–2020 гг. Часть исследований *in vitro* была проведена в рамках зарубежной стажировки в Медицинском университете Вены (г. Вена, Австрия) (Приложение Г).

Актуальность работы. Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смертности в мире и представляют собой одну из наиболее значимых проблем современной медицины. Согласно данным GLOBOCAN 2022, во всем мире было зарегистрировано около 20 миллионов новых случаев рака и 9,7 миллионов смертей, а к 2050 году прогнозируется увеличение глобального бремени рака примерно до 35 миллионов новых случаев [1]. Несмотря на существенный прогресс в хирургии, лучевой терапии, химиотерапии, таргетной терапии и иммунотерапии, эффективность лечения многих злокачественных новообразований по-прежнему ограничивается системной токсичностью, гетерогенностью опухолей и развитием лекарственной устойчивости [2, 3]. В связи с этим сохраняется высокая потребность в поиске новых противоопухолевых соединений с альтернативными механизмами действия, способных повышать чувствительность опухолевых клеток к терапии и преодолевать резистентность к применяемым препаратам.

Одним из перспективных направлений современной фармацевтической химии является разработка координационных соединений, поскольку координационная организация вещества позволяет целенаправленно изменять его реакционную способность, стабильность, растворимость и биологическую активность. Современные обзоры по металлокомплексным противоопухолевым агентам подчеркивают, что такие соединения могут реализовывать механизмы действия, отличные от классических цитостатиков, включая нарушение редокс-гомеостаза, воздействие на митохондриальную функцию и активность в отношении резистентных опухолевых клеток [4]. Это делает координационные системы перспективной платформой для создания новых лекарственных субстанций с заданными фармакологическими свойствами.

Особый интерес представляют иодсодержащие соединения, поскольку в последние годы накоплены данные о противоопухолевых эффектах различных химических форм иода, включая их антипролиферативное и проапоптотическое действие. Показано, что иод и иодсодержащие системы могут быть связаны с модуляцией митохондриальных процессов, окислительного стресса и сигнальных путей клеточной гибели, что делает их перспективными объектами для противоопухолевой терапии [5, 6]. Вместе с тем применение свободного молекулярного иода ограничено его химической реакционной способностью, нестабильностью и трудностями контролируемой доставки, что обосновывает необходимость создания более стабильных и фармацевтически управляемых иодсодержащих систем. Перспективным подходом является создание координационных соединений иода с полимерными и биоорганическими лигандами, способных стабилизировать активный компонент и модифицировать его физико-химические и биологические свойства. Для полимерных иодофоров и иных комплексных иодсодержащих систем показано, что комплексообразование способствует удержанию иода, влияет на его высвобождение и может повышать стабильность системы по сравнению со свободным иодом [7–9]. Следовательно, поиск новых иодсодержащих координационных систем является актуальной задачей как для фармацевтической химии, так и для экспериментальной онкологии.

С позиций современной онкобиологии особую значимость в канцерогенезе имеют соединения, способные воздействовать на нарушения редокс-гомеостаза, митохондриальную функцию и программируемую клеточную гибель в опухолевых клетках [2, 10, 11]. Известно, что уклонение от апоптоза является одним из ключевых механизмов опухолевой прогрессии и терапевтической резистентности, а потому индукция клеточной гибели рассматривается как важная терапевтическая стратегия [2, 12].

В последние годы особое внимание уделяется веществам, способным вызывать нарушение митохондриального мембранного потенциала, усиливать генерацию активных форм кислорода, останавливать клеточный цикл и запускать апоптоз опухолевых клеток. Такой подход особенно важен для преодоления устойчивости опухолевых клеток к стандартной терапии и повышения эффективности комбинированного лечения [13, 14].

Таким образом, разработка нового координационного соединения иода с противоопухолевой активностью, а также комплексное изучение его физико-химических, фармацевтических и биологических свойств являются обоснованной и своевременной научной задачей.

Полученные результаты могут служить основой для дальнейшей доклинической разработки нового отечественного противоопухолевого средства.

Цель исследования. Разработка, изучение физико-химических свойств, биологической активности и оценка противоопухолевого потенциала нового комплекса дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид.

Задачи исследования.

1) Разработать и изучить физико-химические свойства нового координационного соединения иода.

2) Изучить биологическую активность координационного соединения иода на различных линиях опухолевых клеток.

3) Изучить комбинированное действие координационного соединения иода с известными противоопухолевыми препаратами на различных опухолевых линиях клеток.

4) Исследовать молекулярно-клеточные механизмы противоопухолевого действия координационного соединения иода.

5) Оценить генотоксичность *in vitro* координационного соединения иода.

6) Исследовать *in vivo* эффективность комбинированного применения координационного соединения иода с противоопухолевым препаратом на экспериментальной модели перевиваемого рака.

Объекты исследования: Координационное соединение иода с биополимерами. Культуры нормальных и опухолевых клеток из Американской коллекции типированных культур (ATCC, Manassas, США). Перевиваемая аффинитетная опухоль (карцинома) яичника крыс (Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии) (г.Алматы, Казахстан). Тест-штаммы микроорганизмов (ATCC, Manassas, США) и (NBRC, NITE, Япония), а также лабораторные крысы Wistar.

Методы исследования: В работе использован комплекс современных фармацевтико-химических, биотехнологических, молекулярно-клеточных и фармакологических методов исследования. Для характеристики координационного соединения иода применяли квантовохимическое моделирование *in silico*, методы синтеза и оценки фармацевтических показателей качества, ультрафиолетовую, инфракрасную и Раман-спектроскопию, а также методы изучения стабильности вещества. Биологическую активность соединения *in vitro* оценивали с использованием методов культивирования клеточных линий, определения жизнеспособности, пролиферативной и цитотоксической активности, анализа апоптоза, колониеобразования, клеточного цикла, фрагментации ДНК методом TUNEL, определения митохондриального мембранного потенциала, оценки окислительного стресса, вестерн-блоттинга, микроядерного теста, проточной цитометрии, электрофореза, флуоресцентной и световой микроскопии. Генотоксический потенциал соединения изучали с применением бактериального теста обратных мутаций, методов субкультивирования, реактивации и криоконсервации тест-штаммов, а также оценки мутагенной активности в условиях наличия и отсутствия метаболической активации. Исследования *in vivo* включали оценку острой токсичности и эффективности на экспериментальных моделях у крыс с последующей морфологической, количественной и статистической обработкой полученных данных. При анализе показателей выживаемости использовали метод Каплана-Мейера с оценкой различий между группами с применением log-rank теста.

Научная новизна

Впервые получено новое оригинальное биологически активное вещество дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид (КС-144), и изучены его физико-химические и некоторые фармацевтические свойства.

Впервые установлена антипролиферативная и цитотоксическая активность КС-144 в отношении различных линий опухолевых клеток *in vitro*, что позволило охарактеризовать его как перспективный объект для дальнейших фармакологических и доклинических исследований.

Впервые показано, что соединение КС-144 проявляет биологическую активность в отношении как чувствительных, так и лекарственно-резистентных опухолевых клеточных моделей, включая цисплатин-резистентную линию мезотелиомы P31res1.2, что указывает на его потенциальную значимость для разработки подходов к преодолению лекарственной устойчивости опухолевых клеток.

Впервые установлено, что КС-144 оказывает потенцирующее действие при комбинированном применении с известными противоопухолевыми препаратами, включая доксорубицин и цисплатин на линии чувствительных и резистентных опухолевых клеток, что расширяет понимание возможности его применения в составе комбинированной противоопухолевой терапии.

Впервые показано, что противоопухолевое действие КС-144 связано с реализацией комплекса внутриклеточных и молекулярных механизмов, включая нарушение митохондриального мембранного потенциала, увеличение образования активных форм кислорода, остановку клеточного цикла и индукцию апоптотической гибели опухолевых клеток.

Впервые проведена предварительная оценка эффективности КС-144 в комбинации с доксорубицином на экспериментальной модели перевиваемого рака карциномы яичников крыс, а также оценены острая токсичность и генотоксичность, что позволило определить перспективность дальнейшей доклинической разработки.

На основе полученных результатов получен патент на изобретение Республики Казахстан №35927 от 28.10.2022 «Координационное соединение дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид, обладающее противоопухолевым действием» (Приложение А).

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о взаимосвязи химической структуры координационного соединения иода с его физико-химическими свойствами, стабильностью, биологической активностью и механизмами противоопухолевого действия. Полученные результаты дополняют научные представления о биологической активности полииодидных координационных соединений и обосновывают перспективность дальнейшего изучения КС-144 как потенциального адъювантного средства при совместном применении с противоопухолевыми препаратами.

В ходе исследования показано, что КС-144 представляет собой биологически активную, термостабильную лекарственную субстанцию, перспективную для дальнейшей фармацевтической разработки. Практическая значимость работы состоит в разработке технологической схемы получения лекарственной субстанции КС-144, которая может быть использована при создании опытно-промышленного регламента производства. Проведенная стандартизация состава субстанции и определение основных показателей качества создают основу для дальнейшей фармацевтической разработки лекарственных форм. Результаты исследования внедрены в практическую деятельность опытного производства АО «НЦПП», что подтверждается актом внедрения (Приложение В). Полученные данные о фармакологической эффективности и токсичности КС-144 могут быть использованы при последующих доклинических исследованиях по стандартам GLP. По результатам работы получен патент на изобретение №35927 (Приложение А). Результаты могут быть применены в дальнейшей фармацевтической разработке и доклинических испытаниях новой лекарственной субстанции, потенциально применимой в комбинации с противоопухолевыми препаратами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработано и получено новое координационное соединение иода с полипептидами и декстрином КС-144. Установлены его основные физико-химические свойства и спектральные характеристики; полученные данные согласуются с присутствием иодидных, трииодидных и полииодидных форм и их стабилизацией полисахаридно-пептидной матрицей.
2. Субстанция КС-144 представляет собой порошок коричнево-фиолетового цвета с запахом иода, хорошо растворима в воде, сохраняет стабильность при температуре $25 \pm 2°C$ и влажности $60 \pm 5\%$ в течение 12 месяцев и может быть использована для разработки новых фармацевтических форм.
3. Показано, что клетки мезотелиомы P31 и P31res1.2 были более чувствительны к КС-144 ($ЦТК_{50}$ 0,306 и 0,465 мг/мл, соответственно), чем нормальные мезотелиальные клетки МеТ-5А ($ЦТК_{50}$ 1,30 мг/мл). Это указывает на умеренную селективность КС-144 в отношении опухолевых мезотелиальных клеток.
4. Установлено, что КС-144 проявляет потенцирующее действие при комбинации с цисплатином и доксорубицином на опухолевых клеточных линиях. Синергический эффект КС-144 и доксорубицина показан на линии клеток К562, а также на клетках мезотелиомы P31 и P31res1.2 с цисплатином. Отсутствие антагонизма подтверждает безопасность совместного применения КС-144 с изученными препаратами. Клоногенный анализ подтвердил отсутствие развития резистентности и возможность длительно подавлять пролиферативный потенциал опухолевых клеток.
5. Показано, что противораковая активность КС-144 в диапазоне концентраций 0,125 - 0,25 мг/мл обусловлена тремя возможными механизмами: за счет запуска потери митохондриального мембранного потенциала, увеличения продукции активных форм кислорода и апоптоза с

остановкой клеточного цикла в пресинтетическом периоде интерфазы с переходом в G_0/G_1 фазу.

6. В батарее тестов *in vitro* на генотоксичность методом Эймса и в микроядреном анализе клеток мышиной лимфомы L5178Y TK+/- субстанция КС-144 не показала мутагенного потенциала.
7. По результатам изучения острой токсичности КС-144 на крысах при пероральном введении, установлено, что в условиях проведенного исследования средняя смертельная доза ($ЛД_{50}$) превышает 4000 мг/кг.
8. Комбинированное действие КС-144 при дозе 400 мг/кг и доксорубицина на модели аффинитетной карциномы яичников крыс увеличивает продолжительность жизни крыс на 64%.

Связь с планом основных работ

Диссертационная работа выполнялась в рамках научно-технических программ «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2015–2017 гг.» (шифр НТП О.0671, № государственной регистрации 0115РК00390) и «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018–2020 гг.» (шифр НТП О.0777, № государственной регистрации 0118РК00003), реализованных АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» в рамках программно-целевого финансирования Министерства по инвестициям и развитию Республики Казахстан.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на следующих международных конференциях:

- IV Международные Фарабиевские чтения, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Республика Казахстан, 4 - 18 апреля 2017 г.;
- Международный симпозиум «Астана Биотех 2018», Национальный центр биотехнологии, Астана, Республика Казахстан, 12 - 13 июня 2018 г.;
- VI Международные Фарабиевские чтения, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Республика Казахстан, 2 - 12 апреля 2019 г.;
- International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM. - 2020 г.;
- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі», Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Республика Казахстан, 6 - 8 апреля 2023 г.;
- International Scientific Conference of Young Scientists “Fundamental and applied research in molecular biology, biochemistry and biotechnology”, dedicated to the 40th anniversary of the M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Republic of Kazakhstan, 17 November 2023;
- International Scientific Forum “Modern Trends in Sustainable Development of Biological Sciences” (IFBioScFU 2024), BIO Web of Conferences Vol.100, Almaty, Republic of Kazakhstan, March 27 - 28, 2024.

Личный вклад автора

Автор диссертационной работы провел сбор и анализ литературных данных по изучаемой проблеме, провел экспериментальную работу по изучению фармакологических и биологических свойств КС-144, включая оценку противоопухолевой активности, комбинированного действия с противопухолевыми препаратами, механизмов действия и показателей безопасности. Автор провел статистическую обработку полученных результатов, проанализировал и интерпретировал их, а также написал и оформил рукопись диссертации.

Также получен патент на изобретение РК № 35927 (Приложение А) и Акт внедрения (Приложение В).

Публикации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 16 научных работ и получен 1 патент на изобретение Республики Казахстан (Приложение А и Приложение Б), в том числе:

- 2 статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus, включая 1 статью в журнале первого квартиля (Q1, CiteScore 90-й процентиль) и 1 статью в журнале четвертого квартиля (Q4);
- 3 статьи в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных КОКСНВО МНВО РК;
- 1 статья в зарубежном рецензируемом научном журнале, не индексируемом в базе данных Scopus;
- 1 глава в международной коллективной монографии;
- 9 публикаций в сборниках материалов международных научных конференций;
- 1 патент Республики Казахстан на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 171 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, а также заключения, списка использованных источников из 283 наименований. Диссертация содержит 20 таблиц, 39 рисунков и 12 приложений.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность научным консультантам – кандидату биологических наук, ассоциированному профессору Исламову Ринату Алимжановичу и PhD, DSc Armen Nersesyan – за ценные консультации, постоянное внимание к работе и поддержку на всех этапах выполнения диссертационного исследования. Особую благодарность автор выражает академику КазНАЕН, доктору химических наук Ильину Александру Ивановичу за ценные рекомендации и консультации, оказанные в процессе выполнения и подготовки диссертационной работы и Assoc. Prof. Dr. Michael Grusch (Center for Cancer Research, Medical University of Vienna) за методическую помощь, организацию зарубежной научной стажировки и значительный вклад в проведение исследований и профессиональное становление автора.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Предпосылки и пробел в исследованиях

Рак остается одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире, представляя собой серьезную глобальную проблему здравоохранения и критическую задачу для современной медицины.

Текущая онкологическая ситуация как в мире, так и в Казахстане характеризуется устойчивой тенденцией к росту, что подтверждается национальными и международными статистическими данными. По последним глобальным оценкам, ежегодно в мире диагностируется около 20 миллионов новых случаев рака, и ожидается, что в ближайшие десятилетия это число значительно возрастет [1].

Последние национальные отчеты в Казахстане указывают на то, что показатель заболеваемости достиг примерно 211,4 случаев на 100 000 населения. В 2024 году было зарегистрировано более 41 000 новых случаев рака, а общее число пациентов, находящихся под онкологическим наблюдением, превысило 230 000, что отражает устойчивый ежегодный рост [15–17].

Анализ долгосрочных тенденций показывает, что рак остается одной из ведущих причин смертности как в мире, так и в Казахстане. Наиболее распространенными причинами смерти от рака являются рак молочной железы, легких, желудка и толстой кишки. Кроме того, некоторые злокачественные новообразования, такие как рак печени и поджелудочной железы, демонстрируют устойчивый рост как заболеваемости, так и смертности в последние годы [18, 19].

Таким образом, продолжающийся рост заболеваемости и смертности от рака, наряду с увеличением числа пациентов, нуждающихся в длительном медицинском наблюдении, подчеркивает значительное медицинское и социально-экономическое бремя онкологических заболеваний. Это подчеркивает острую необходимость разработки новых, более эффективных и безопасных терапевтических стратегий.

Несмотря на существенные достижения в онкологии, включая улучшение ранней диагностики, таргетной терапии и иммунотерапии, многие злокачественные новообразования по-прежнему трудно поддаются лечению. Основным ограничением современных противораковых подходов является развитие терапевтической резистентности. Опухолевые клетки обладают замечательной пластичностью, позволяющей им адаптироваться к лечению посредством генетических мутаций, эпигенетических модификаций и метаболического перепрограммирования. В результате изначально эффективные методы лечения часто теряют свою эффективность, что приводит к прогрессированию опухоли и неудовлетворительным результатам лечения пациентов [20, 21].

Традиционная химиотерапия продолжает играть центральную роль в лечении рака; однако она связана со значительными ограничениями.

Цитотоксические препараты, такие как антрациклины и соединения на основе платины, не обладают селективностью и воздействуют как на злокачественные, так и на здоровые быстро делящиеся клетки. Это приводит к серьезным побочным эффектам, включая кардиотоксичность, нефротоксичность и миелосупрессию, что ограничивает их клиническое применение. Кроме того, возникновение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), обусловленной такими механизмами, как выведение лекарственных препаратов, усиление репарации ДНК и ингибирование апоптоза, остается серьезным препятствием для успешного лечения [22].

В последние годы таргетная терапия и иммунотерапевтические подходы значительно улучшили результаты лечения некоторых типов рака. Эти стратегии направлены на повышение специфичности путем воздействия на молекулярные пути или модуляции иммунного ответа. Однако их эффективность часто ограничена определенными группами пациентов, и механизмы резистентности все еще развиваются. Более того, высокая стоимость и иммуноопосредованные побочные эффекты ограничивают их более широкое клиническое применение [21].

Одной из фундаментальных особенностей рака является способность опухолевых клеток избегать запрограммированной клеточной смерти, в частности апоптоза. Нарушение регуляции апоптотических путей позволяет злокачественным клеткам выживать в условиях, которые обычно вызывают гибель клеток, включая воздействие цитотоксических агентов. Поэтому индукция апоптоза остается центральным механизмом действия многих противораковых методов лечения. Однако раковые клетки часто разрабатывают стратегии подавления или обхода апоптотических сигналов, что способствует резистентности к лечению и рецидиву заболевания.

Еще одним важным аспектом биологии опухолей является роль активных форм кислорода (АФК). Раковые клетки обычно демонстрируют нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза, характеризующееся повышенной продукцией АФК. В то время как умеренные уровни АФК могут способствовать прогрессированию опухоли и геномной нестабильности, чрезмерное накопление АФК может вызывать окислительный стресс и запускать апоптоз. Эта двойная роль делает модуляцию АФК многообещающей терапевтической стратегией в онкологии, либо путем увеличения окислительного стресса сверх допустимых уровней, либо путем нарушения антиоксидантных защитных систем [23].

В этом контексте иод и его производные привлекают все больше внимания благодаря своей биологической активности, выходящей за рамки их классической роли в синтезе гормонов щитовидной железы. Недавние исследования показывают, что иод проявляет антипролиферативное и проапоптотическое действие в различных линиях раковых клеток, включая модели рака молочной железы [5].

Эти эффекты связаны со множеством механизмов, таких как модуляция митохондриальных путей, активация рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом гамма (PPARγ), и образование биоактивных

иодированных липидов. Кроме того, было показано, что иод влияет на окислительный стресс и иммунные реакции, что дополнительно подтверждает его потенциал в качестве противоракового средства [24].

Однако, несмотря на многообещающую биологическую активность, клиническое применение молекулярного иода остается ограниченным. Его высокая химическая реактивность, нестабильность и местное раздражающее действие осложняют его использование в качестве терапевтического средства. Эти ограничения подчеркивают необходимость разработки новых соединений на основе иода с улучшенной стабильностью, контролируемой доставкой и повышенной селективностью по отношению к опухолевым клеткам.

Одним из наиболее перспективных подходов к преодолению этих ограничений является разработка иодсодержащих координационных соединений. Координационные комплексы обладают значительными преимуществами, включая улучшенную физико-химическую стабильность, регулируемые фармакокинетические свойства и потенциал для адресной доставки. Успех препаратов на основе металлов, таких как соединения платины, демонстрирует клиническую значимость координационной химии в онкологии и поддерживает исследование новых классов металлосодержащих терапевтических средств [25].

Несмотря на растущий интерес к соединениям на основе иода, в нашем понимании их молекулярных механизмов действия остаются значительные пробелы. В частности, взаимосвязь между структурой координационных комплексов иода и их биологической активностью, включая их способность индуцировать апоптоз и модулировать окислительный стресс, до конца не изучена. Кроме того, их потенциальная роль в преодолении лекарственной устойчивости и повышении эффективности существующих химиотерапевтических препаратов недостаточно исследована.

Таким образом, существует критический пробел в исследованиях на стыке химии иода, регуляции апоптоза и разработки противораковых препаратов. Для решения этой проблемы необходимы всесторонние исследования новых иодсодержащих координационных соединений, включая их физико-химические свойства, биологическую активность и молекулярные механизмы действия. Такие исследования могут способствовать разработке инновационных терапевтических стратегий, направленных на повышение эффективности лечения при одновременном снижении токсичности и преодолении резистентности в терапии рака.

1.2 Современные стратегии противораковой терапии

Быстрое развитие онкологии за последние десятилетия привело к появлению множества терапевтических стратегий, направленных на улучшение результатов лечения рака. Эти подходы различаются по механизмам действия, специфичности, эффективности и профилю безопасности. Несмотря на значительный прогресс, до сих пор не выявлена универсальная стратегия, которая эффективно уничтожала бы опухоли без побочных эффектов или

резистентности. Поэтому понимание сильных и слабых сторон существующих терапевтических подходов имеет важное значение для разработки новых противораковых препаратов.

На рисунке 1 наглядно демонстрируются внутренние и внешние биологические/молекулярные события, способствующие развитию рака. На рисунке 1 показаны основные факторы, влияющие на его образование: воспаление, генетические мутации, канцерогены, биологические агенты и вредный образ жизни. Диаграмма изображает постепенное превращение здоровой клетки в раковую посредством нарушения клеточного цикла. Основными признаками рака являются ускользание клетки от апоптоза, неограниченная пролиферация, ангиогенез, метастазирование, уклонение от иммунной системы и гетерогенность опухоли [26].

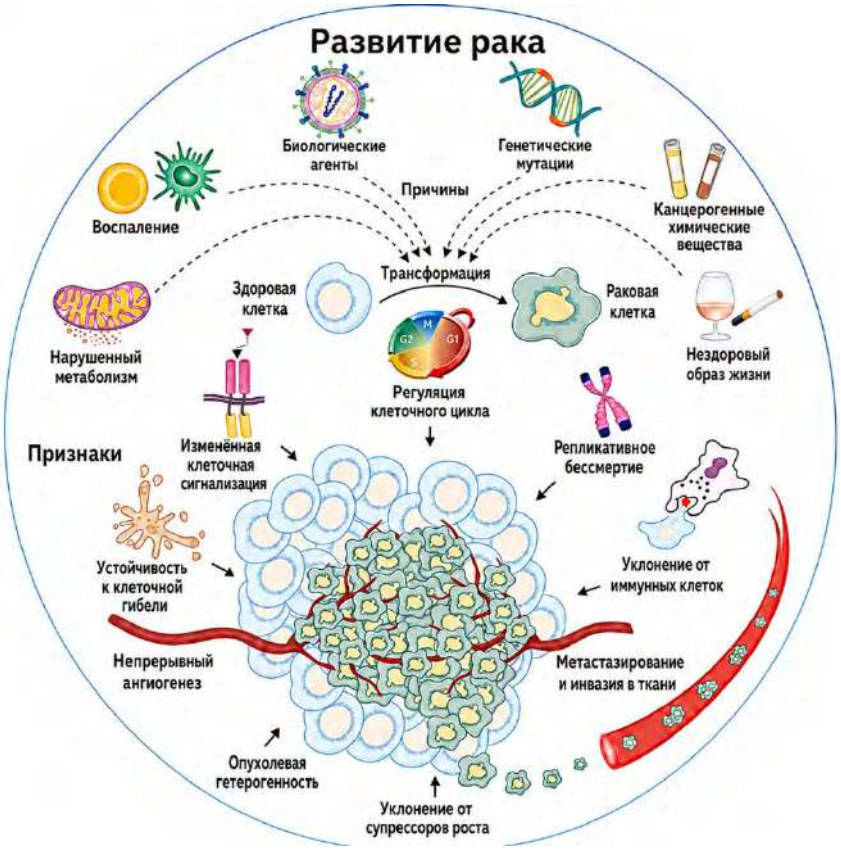


Рисунок 1 – Схематическое изображение, демонстрирующее различные внутренние и внешние биологические/молекулярные события, способствующие трансформации нормальной клетки в раковую, при этом нижняя часть схемы показывает различные признаки трансформированной раковой клетки [26]

Традиционная химиотерапия

Традиционная химиотерапия остается одним из наиболее широко используемых и фундаментальных подходов в лечении рака. Она основана на применении цитотоксических препаратов, которые воздействуют на быстро делящиеся клетки, вмешиваясь в процессы репликации ДНК, транскрипции или митоза.

К наиболее важным классам химиотерапевтических препаратов относятся антрациклины (например, доксорубицин) и соединения на основе платины (например, цисплатин).

Антрациклины оказывают свое противоопухолевое действие главным образом за счет интеркаляции ДНК и ингибирования топоизомеразы II, что приводит к повреждению ДНК и апоптозу (рисунок 2). Доксорубицин, один из наиболее часто используемых антрациклинов, широко применяется при лечении рака молочной железы, лимфом, сарком и других злокачественных новообразований. Однако его клиническое применение ограничено дозозависимой кардиотоксичностью, которая может привести к необратимому повреждению сердца [26]. Кроме того, появление множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), опосредованной усиленной репарацией ДНК, насосами для выведения лекарственных препаратов и подавлением апоптоза, значительно снижает эффективность лечения [26].

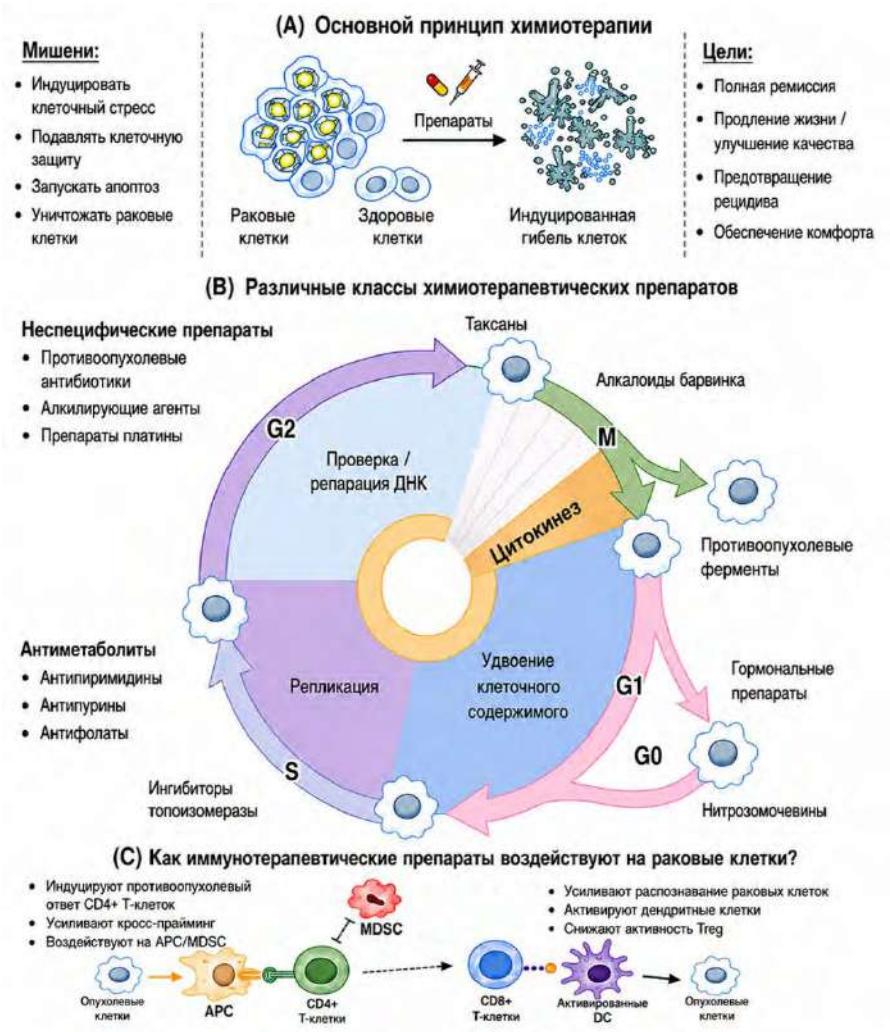


Рисунок 2 – Схематическое изображение основных принципов химиотерапии (A), различных классов химиотерапевтических препаратов/лекарств (B) и иммунотерапевтических механизмов воздействия на раковые клетки (C) [26]

Препараты на основе платины, включая цисплатин, действуют путем образования внутри- и межцепочечных сшивок с ДНК, тем самым ингибируя репликацию и транскрипцию ДНК. Эти препараты высокоэффективны против широкого спектра солидных опухолей, включая рак легких, яичников и яичек. Тем не менее, их применение связано с серьезными побочными эффектами, включая нефротоксичность, нейротоксичность и ототоксичность [27, 28].

Несмотря на свою эффективность, традиционные химиотерапевтические препараты страдают от фундаментального ограничения: отсутствия селективности. Эти препараты воздействуют не только на раковые клетки, но и на нормальные пролиферирующие клетки, что приводит к системной токсичности. Кроме того, опухолевые клетки часто развивают резистентность за счет таких механизмов, как усиление репарации ДНК, выведение препарата и ингибирование апоптоза [29].

Таким образом, хотя химиотерапия остается краеугольным камнем лечения рака, ее ограничения требуют разработки более селективных и менее токсичных терапевтических подходов.

Таргетная терапия

Таргетная терапия представляет собой значительный прогресс в онкологии, фокусируясь на конкретных молекулярных путях, участвующих в росте и выживании опухоли. К ним относятся сигнальные каскады, такие как EGFR, VEGF и HER2.

Таргетные препараты, включая ингибиторы тирозин-киназы и моноклональные антитела, обеспечивают повышенную специфичность по сравнению с традиционной химиотерапией, снижая внецелевую токсичность. Кроме того, достижения в системах доставки лекарств, таких как наночастицы-носители, еще больше повысили селективность и эффективность таргетной терапии [30].

Однако таргетная терапия не лишена ограничений. Гетерогенность опухоли и возникновение резистентности в результате вторичных мутаций или механизмов обхода сигнальных путей остаются серьезными проблемами. Более того, эти методы лечения эффективны только у пациентов, чьи опухоли экспрессируют специфические молекулярные мишени [31].

Иммунотерапия

Иммунотерапия произвела революцию в лечении рака, используя иммунную систему организма для уничтожения опухолевых клеток. Наиболее распространенными подходами являются ингибиторы иммунных контрольных точек (например, ингибиторы PD-1, PD-L1, CTLA-4) и CAR-T-клеточная терапия.

Недавние исследования показывают, что иммунотерапия может привести к длительной ремиссии при некоторых видах рака, особенно при гематологических злокачественных новообразованиях и меланоме [32]. Блокада иммунных контрольных точек усиливает активацию Т-клеток и преодолевает вызванное опухолью подавление иммунитета, что делает ее одной из наиболее революционных терапевтических стратегий в онкологии [33].

Однако иммунотерапия эффективна только у части пациентов. Механизмы резистентности, барьеры микроокружения опухоли и уклонение от иммунного ответа значительно ограничивают ее успех. Кроме того, иммуноопосредованные побочные эффекты остаются серьезной проблемой [34].

Синтетическая летальность

Синтетическая летальность – это новая стратегия, направленная на специфические генетические уязвимости раковых клеток. Этот подход основан на концепции, согласно которой одновременное нарушение двух путей приводит к гибели клетки, тогда как ингибирование любого из путей по отдельности недостаточно.

Хорошо известным примером является использование ингибиторов PARP при раке с мутациями BRCA, где дефектные механизмы репарации ДНК делают опухолевые клетки крайне чувствительными к дополнительному геномному стрессу.

Эта стратегия обладает высокой селективностью и является ключевым компонентом прецизионной онкологии. Однако её применение ограничено опухолями со специфическими генетическими изменениями, а механизмы резистентности остаются проблемой [35].

Современная противораковая терапия представляет собой многогранную область, включающую химиотерапию, таргетную терапию, иммунотерапию и синтетическую летальность (таблица 1). Хотя эти подходы значительно улучшили клинические результаты, они имеют общие ограничения, включая токсичность, резистентность и ограниченную применимость для пациентов.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика современных подходов в лечении онкологических заболеваний [26]

Подход	**Механизм действия**	**Преимущества**	**Ограничения**
Химиотерапия	Повреждение ДНК, ингибирование деления клеток	Широкая применимость, высокая эффективность	Токсичность, низкая селективность, лекарственная устойчивость
Таргетная терапия	Ингибирование специфических молекулярных путей	Высокая специфичность, сниженная токсичность	Ограниченная применимость, развитие резистентности, высокая стоимость
Иммунотерапия	Активация иммунного ответа	Потенциал длительной ремиссии	Вариабельный ответ, иммунная токсичность
Синтетическая летальность	Воздействие на генетические уязвимости	Высокая точность, селективное действие	Требует наличия мутаций, развитие резистентности

Недавние исследования подчеркивают важность комбинированных стратегий и разработки новых препаратов, способных модулировать пути апоптоза и окислительного стресса [36].

Поэтому поиск новых терапевтических соединений с альтернативными механизмами действия остается критически важным приоритетом в онкологии.

1.3 Апоптоз как ключевая терапевтическая мишень при раке

Апоптоз, или запрограммированная клеточная смерть, играет центральную роль в поддержании тканевого гомеостаза и удалении поврежденных или аномальных клеток [3]. При раке одним из фундаментальных биологических изменений является нарушение апоптотических путей, что позволяет злокачественным клеткам выживать, бесконтрольно размножаться и сопротивляться терапевтическим вмешательствам. Поэтому апоптоз стал критически важной терапевтической мишенью в современной онкологии.

Роль апоптоза в канцерогенезе

Способность избегать апоптоза признана одним из ключевых признаков рака. В обновленной концепции «hallmarks of cancer» устойчивость к клеточной смерти рассматривается как одно из ключевых свойств, обеспечивающих выживание, прогрессирование и терапевтическую резистентность злокачественных клеток. Нарушение апоптоза позволяет клеткам с генетическими повреждениями сохранять жизнеспособность, избегать иммунного и терапевтического контроля, а также формировать более агрессивные формы опухоли [37].

Опухолевые клетки приобретают множество механизмов подавления апоптотического сигнала, включая сверхэкспрессию антиапоптотических белков (таких как Bcl-2), снижение уровня проапоптотических факторов (например, Bax, p53) и изменения в путях рецепторов клеточной смерти. Эти изменения позволяют раковым клеткам выживать в условиях, которые обычно вызывают гибель клеток, таких как повреждение ДНК или окислительный стресс [3, 38].

Важно отметить, что подавление апоптоза напрямую связано с развитием терапевтической резистентности. Многие противораковые методы лечения, включая химиотерапию и лучевую терапию, основаны на индукции апоптоза как на основном механизме действия. Однако опухолевые клетки часто развивают резистентность, нарушая апоптотическую сигнализацию, за счет нарушения митохондриального пути апоптоза, повышения экспрессии BCL-2, BCL-XL, MCL1 и белков семейства IAP, а также за счет адаптации к стрессовым условиям опухолевого микроокружения. Поэтому восстановление чувствительности опухолевых клеток к апоптозу является важным направлением преодоления лекарственной устойчивости [3, 39].

Недавние исследования подтверждают, что нарушение регуляции апоптоза является основным фактором агрессивности опухоли и неблагоприятных клинических исходов, подчеркивая его важность как терапевтической мишени [40, 41]. В связи с этим молекулы, регулирующие апоптоз, включая белки семейства BCL-2, каспазы, IAP-белки, SMAC/DIABLO и компоненты

митохондриальной мембраны, рассматриваются как перспективные терапевтические мишени для разработки новых противоопухолевых стратегий [39].

Основные пути апоптоза

Апоптоз опосредуется несколькими взаимосвязанными сигнальными путями, наиболее важными из которых являются митохондриальный (внутренний), рецептор-опосредованный (внешний) и каспазонезависимый пути. Несмотря на различия в исходных сигналах активации, эти пути часто сходятся на уровне активации эффекторных каспаз, повреждения митохондрий и необратимой деградации клеточных структур. Современные данные указывают на тесную связь регуляции апоптоза с другими типами регулируемой клеточной смерти, такими как некроптоз, ферроптоз, пироптоз и клеточная смерть, связанная с аутофагией. Это особенно важно для понимания терапевтической резистентности опухолей [42].

Митохондриальный (внутренний) путь

Внутренний путь активируется в ответ на внутриклеточные стрессовые сигналы, такие как повреждение ДНК, окислительный стресс и гипоксия. Он жестко регулируется семейством белков Bcl-2 (например, BAX и BAK), расположенными во внешней митохондриальной мембране, которые контролируют проницаемость митохондриальной мембраны [38].

Активация проапоптотических белков приводит к пермеабилизации внешней митохондриальной мембраны (MOMP), что приводит к высвобождению цитохрома С и последующей активации каспаз [43]. Этот путь играет центральную роль в ответе на многие противоопухолевые препараты. Цитохром С связывается с белком APAF1, который, в свою очередь, образует многокомпонентный апоптосом в АТФ-зависимой манере. Прокаспаза-9, связанная с апоптосомой, активируется, а затем активирует каспазу-3 [3, 38].

Белки семейства IAP ингибируют активность каспаз, в то время как SMAC может обратить это ингибирование. Антиапоптотические члены семейства BCL-2 (BCL-2, BCL-XL, MCL1 и др.) ингибируют действие проапоптотических белков (BAX, BAK). Белки, содержащие только домен BH3 (BIM, BAD, BID, PUMA, NOXA), могут подавлять активность MCL1 [40, 44]. Следует отметить, что повышенная проницаемость митохондриальной мембраны является «необратимой» стадией клеточной смерти (рисунок 3).

Важность митохондриальной дисфункции и окислительно-восстановительного дисбаланса в запуске апоптоза делает этот путь ключевой мишенью для терапевтического вмешательства [3, 40].

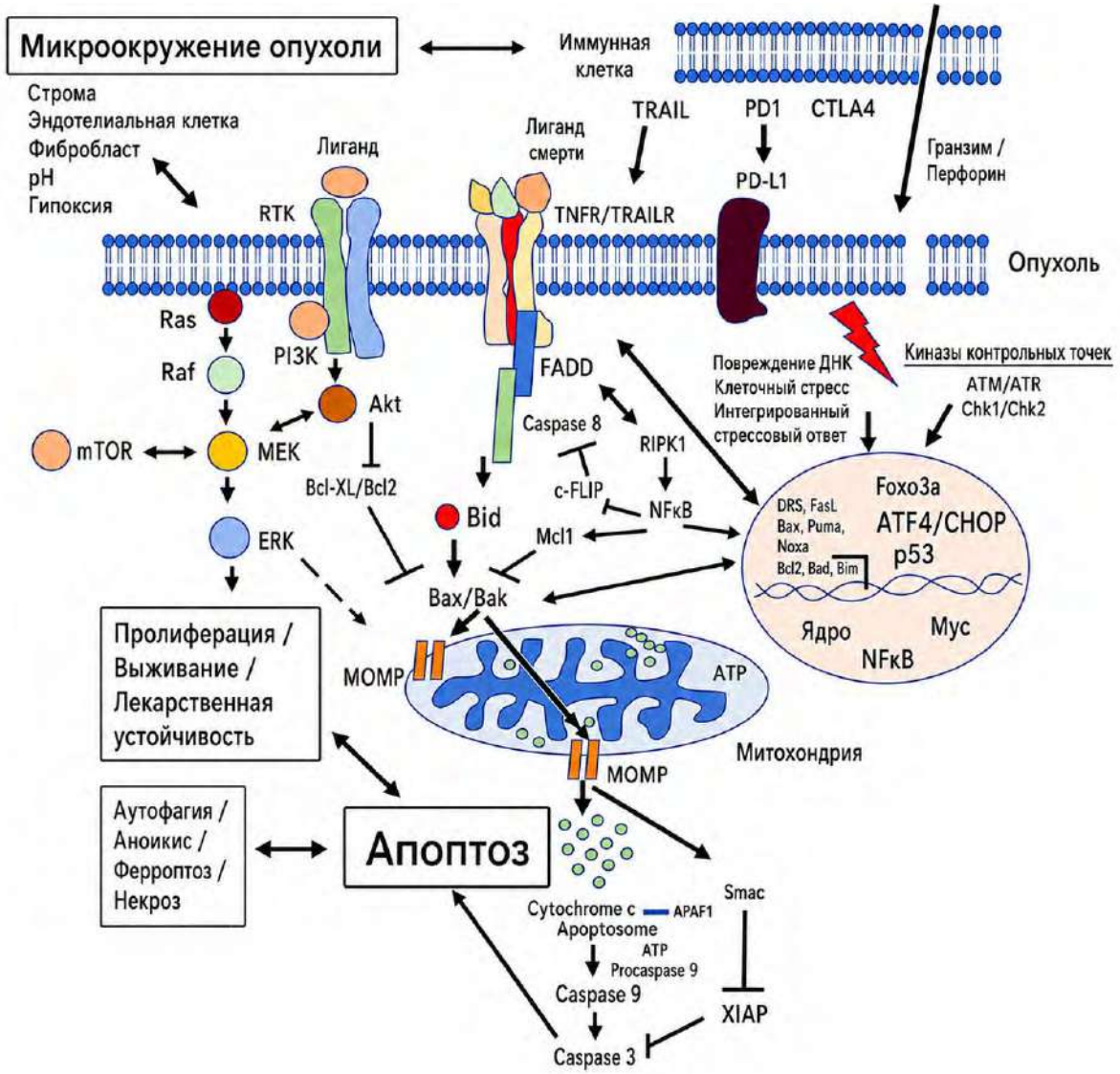


Рисунок 3 – Обзор сигнальных путей апоптоза и факторов микроокружения, способствующих выживанию, иммунному ответу и развитию опухоли [40]

Рецептор-опосредованный (внешний) путь

Внешний путь инициируется связыванием лигандов с рецепторами смерти на поверхности клетки, такими как рецепторы Fas (CD95) и TNF-связанного апоптоз-индуцирующего лиганда (Fas-R, TRAIL-R1/2, TNF-R1/2). При связывании лигандов образуется DISC (сигнальный комплекс, индуцирующий смерть) с участием FADD и каспазы-8. Активация каспазы-8, а в отдельных случаях и каспазы-10, приводит к расщеплению белка Bid, которая взаимодействует с митохондриями и тем самым усиливает апоптотический сигнал [45].

Белок c-FLIP ингибирует активацию каспазы-8. Кроме того, рецепторные тирозин-киназы, активируемые факторами роста (например, EGFR, HER2), усиливают сигналы, поддерживающие выживание клеток, через пути PI3K/Akt и

RAS-MAPK. Эти пути ингибируют апоптоз путем фосфорилирования белков BCL-2.

Рецепторы TNF и TRAIL активируют сигнальный путь NF-κB, увеличивая экспрессию антиапоптотических генов, что в ряде случаев снижает чувствительность клеток к гибели и способствует их выживанию. Таким образом, одни и те же рецепторные системы могут участвовать как в индукции апоптоза, так и в формировании защитных клеточных ответов.

Иммунная система также может запускать апоптоз через внешние пути. Например, естественные клетки-киллеры (NK-клетки) могут экспрессировать или секретироватьTRAIL в ответ действие на интерфероны. Кроме того, цитотоксические Т-клетки и NK-клетки секретируют гранзимы, которые через перфорин создают отверстия в клеточной мембране и индуцируют апоптоз опухолевых клеток [46].

На реализацию программ клеточной гибели оказывает влияние и опухолевое микроокружение. Стромальные клетки, опухоль-ассоциированные фибробласты, особенности межклеточного матрикса, гипоксия, дефицит питательных веществ и другие физико-химические факторы могут изменять чувствительность опухолевых клеток к лекарственным препаратам. Препараты, воздействующие на эндотелий, лишают опухолевые клетки питательных веществ, что приводит к их гибели.

Важную роль в регуляции апоптоза играют системы ответа на повреждение ДНК (ATM/ATR, Chk1/Chk2) и пути клеточного стресса (ATF4, CHOP) активируют проапоптотические гены (Bax, Puma, Noxa, DR5, FasL) через p53, вызывая гибель клеток. Кроме того, для ряда ингибиторов киназ описана способность повышать транскрипцию гена BIM (рисунок 3) [40].

Следует отметить, что апоптоз тесно связан с другими формами регулируемой клеточной гибели и адаптационными процессами, включая аутофагию, аноикис, ферроптоз и регулируемый некроз. Эти процессы могут изменяться под действием противоопухолевой терапии и влиять на чувствительность опухолевых клеток к лекарственным воздействиям [47].

Этот путь особенно важен для иммунотерапии и таргетной терапии, направленной на активацию иммуноопосредованной гибели опухолевых клеток. Однако раковые клетки часто разрабатывают механизмы для уклонения от рецептор-опосредованного апоптоза, включая снижение экспрессии рецепторов смерти и повышение экспрессии ингибиторных белков.

Воздействие на сигнальные пути рецепторов смерти может повысить эффективность терапии, особенно в сочетании с другими противораковыми препаратами [2, 47].

Каспазонезависимые пути

В дополнение к классическому каспазозависимому апоптозу, раковые клетки могут подвергаться каспазонезависимой клеточной смерти, опосредованной такими факторами, как фактор, индуцирующий апоптоз (AIF), и эндонуклеаза G. Эти пути особенно важны в случаях, когда активность каспаз подавлена или нарушена [48].

Хотя каспазонезависимые механизмы изучены меньше, они предоставляют альтернативные пути индукции гибели опухолевых клеток и могут помочь преодолеть резистентность к традиционным методам лечения.

1.4 Терапевтическое значение апоптоза

Индукция апоптоза представляет собой центральный механизм, лежащий в основе эффективности большинства противораковых методов лечения. Химиотерапевтические препараты, таргетные препараты и лучевая терапия в конечном итоге направлены на активацию апоптотических путей в опухолевых клетках [49–52].

Например, антрациклины и препараты на основе платины индуцируют апоптоз посредством повреждения ДНК, в то время как таргетная терапия модулирует сигнальные пути, регулирующие выживание и гибель клеток [51, 52]. Аналогично, иммунотерапия усиливает апоптоз, активируя цитотоксические иммунные ответы против опухолевых клеток [40, 52].

Однако эффективность этих методов лечения часто ограничена способностью раковых клеток избегать апоптоза. Поэтому стратегии, направленные на восстановление апоптотической сигнализации или повышение чувствительности опухолевых клеток к апоптозу, представляют значительный интерес.

В последнее время исследования сосредоточены на разработке новых соединений, которые непосредственно воздействуют на регуляторы апоптоза, модулируют функцию митохондрий или вызывают окислительный стресс, тем самым способствуя гибели опухолевых клеток [36].

Рецепторы смерти 4 и 5 (DR4, DR5) могут быть активированы специфическими агонистическими антителами (например, мапатумабом, конатумабом, Apo2L/TRAIL и др.) [53, 54]. Кроме того, рекомбинантные препараты на основе TRAIL также активируют эти рецепторы, инициируя процесс апоптоза в клетках.

Препараты, называемые BH3-миметиками, ингибируют антиапоптотические члены семейства белков BCL-2. В результате активируются белки BAX и BAK, образуя поры во внешней мембране митохондрий. Это приводит к высвобождению цитохрома C и инициированию апоптоза. В настоящее время несколько препаратов, ингибирующих белки BCL-2, BCL-XL и MCL1, проходят клинические испытания [44].

Сигналы роста в клетках также влияют на апоптоз. Например, пути MEK и AKT поддерживают выживание клеток и ингибируют апоптоз. Таким образом, использование препаратов, ингибирующих эти пути, в сочетании с BH3-миметиками может быть эффективным в уничтожении раковых клеток [44].

Другой способ усиления апоптоза это воздействие на сигнальный путь p53. Для этого используются ингибиторы MDM2. Они повышают активность p53 и способствуют гибели опухолевых клеток.

Соединение под названием ONC201 действует посредством уникального механизма. Оно активирует систему клеточного стрессового ответа (через ATF4 и CHOP), увеличивает экспрессию рецепторов DR5 и индуцирует апоптоз.

Белок SMAC высвобождается из митохондрий вместе с цитохромом С. Цитохром С связывается с белками каспазы-9 и APAF-1, образуя апоптосому. Это приводит к активации каспаз и гибели клеток. Белки IAP ингибируют каспазы, но SMAC или Omi/HtrA2 могут устранить это ингибирование. В этом отношении в настоящее время также изучаются SMAC-миметики (рисунок 4) [40].

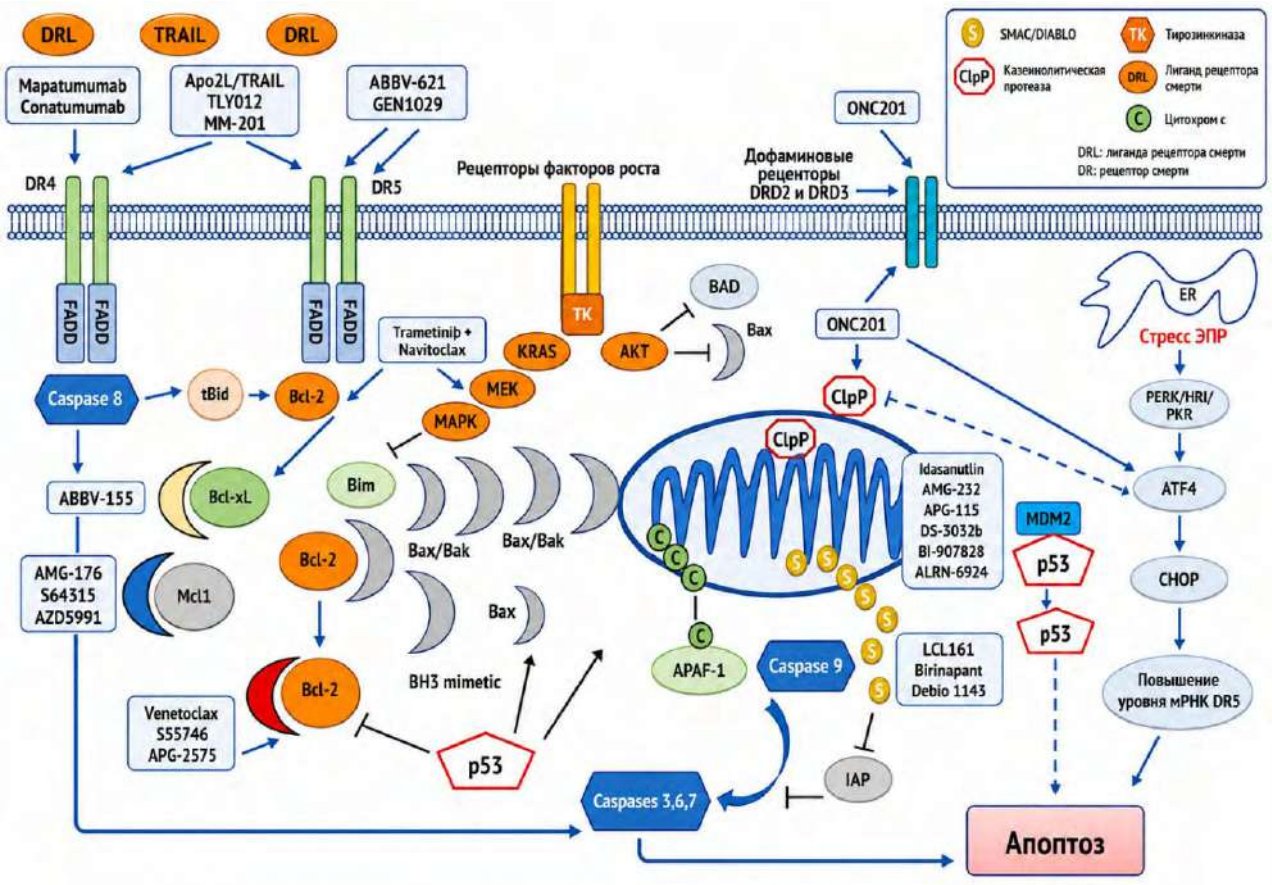


Рисунок 4 – Противораковые терапевтические подходы, направленные на сигнальные пути апоптоза [40]

Таким образом, апоптоз является не только фундаментальным биологическим процессом, но и центральной терапевтической мишенью в лечении рака. Понимание его молекулярных механизмов закладывает основу для разработки инновационных противораковых стратегий. В целом, все эти подходы направлены на уничтожение опухолевых клеток путем активации механизмов апоптоза на разных уровнях.

1.5 Роль АФК в противораковой терапии

АФК - активные формы кислорода, высокореактивные молекулы, образующиеся в результате метаболизма кислорода, которые играют решающую

роль в клеточной сигнализации и гомеостазе. В онкобиологии АФК проявляют двойную и контекстно-зависимую роль, выступая как в качестве факторов, способствующих прогрессированию опухоли, так и в качестве мощных индукторов гибели раковых клеток. Эта двойственность делает АФК перспективной терапевтической мишенью в современной онкологии.

Двойственная роль АФК в раке

Раковые клетки характеризуются повышенным базальным уровнем АФК из-за повышенной метаболической активности, митохондриальной дисфункции и онкогенной сигнализации [55]. При умеренных концентрациях АФК способствуют прогрессированию опухоли, вызывая мутации ДНК, активируя провыживательные сигнальные пути (такие как NF-κB и MAPK) и поддерживая клеточную пролиферацию и ангиогенез [56].

Однако чрезмерное накопление АФК приводит к окислительному стрессу, вызывая повреждение ДНК, белков и липидов. Когда уровень АФК превышает антиоксидантную способность клеток, этот дисбаланс запускает пути клеточной смерти, включая апоптоз [57].

Таким образом, роль АФК в развитии рака парадоксальна: с одной стороны, низкий или умеренный уровень АФК вызывает рост и выживание опухоли, с другой - высокий уровень АФК приводит к гибели опухолевых клеток.

Эта концепция привела к появлению модуляции АФК как терапевтической стратегии, направленной на избирательное увеличение окислительного стресса в раковых клетках сверх их порога толерантности [58].

Митохондрии являются основным источником внутриклеточных АФК и играют центральную роль в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза. В раковых клетках митохондриальная дисфункция приводит к усилению образования АФК, что способствует как прогрессированию опухоли, так и восприимчивости к окислительному стрессу.

Избыток АФК может вызывать деполяризацию митохондриальной мембраны, открытие пор проницаемости и высвобождение проапоптотических факторов, таких как цитохром С. Эти события активируют внутренний апоптотический путь, напрямую связывая АФК с запрограммированной гибелью клеток.

Недавние исследования показывают, что воздействие на генерацию митохондриальных АФК является эффективной стратегией для индукции селективной гибели раковых клеток, поскольку опухолевые клетки часто работают вблизи своего максимального порога окислительного стресса [59, 60].

АФК и апоптоз

АФК тесно связаны с регуляцией апоптотических путей. Повышенные уровни АФК могут активировать проапоптотические белки, ингибировать антиапоптотические факторы и повышать проницаемость митохондриальной мембраны. Кроме того, АФК могут напрямую активировать каспазы или косвенно запускать апоптоз через повреждение ДНК и активацию p53-зависимых путей [23, 61, 62].

Важно отметить, что многие противораковые методы лечения оказывают свое действие посредством апоптоза, опосредованного АФК. Химиотерапевтические препараты, лучевая терапия и некоторые таргетные методы лечения повышают внутриклеточный уровень АФК, тем самым вызывая окислительный стресс и способствуя гибели опухолевых клеток [23, 63].

Кроме того, апоптоз, опосредованный АФК, часто более выражен в раковых клетках, чем в нормальных клетках, из-за измененного окислительно-восстановительного баланса, что обеспечивает определенную избирательность терапевтических вмешательств [57, 63, 64].

Концепция использования АФК в качестве терапевтического инструмента основана на избирательном повышении окислительного стресса в раковых клетках при сохранении нормальных тканей. Для использования этой уязвимости было разработано несколько стратегий. Среди них: агенты, индуцирующие АФК (например, доксорубицин, триоксид мышьяка), ингибиторы антиоксидантных систем (например, истощение глутатиона), препараты, нацеленные на митохондрии, системы доставки АФК на основе наночастиц. Эти подходы направлены на нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза и выведение раковых клеток за пределы порога окислительного стресса, что приводит к апоптозу или другим формам клеточной смерти. Недавние достижения также включают разработку редокс-активных соединений, способных контролируемым образом модулировать выработку АФК, повышая терапевтическую эффективность при минимизации токсичности [11, 23, 63].

Модуляция уровней АФК представляет собой многообещающую стратегию для преодоления лекарственной устойчивости и повышения эффективности существующих методов лечения. Поскольку многие резистентные раковые клетки демонстрируют измененную регуляцию окислительно-восстановительного баланса, воздействие на пути АФК может восстановить чувствительность к лечению.

Более того, сочетание агентов, индуцирующих АФК, с традиционными методами лечения показало синергический эффект, улучшая результаты лечения в различных моделях рака.

Таким образом, АФК являются не просто побочными продуктами клеточного метаболизма, а ключевыми регуляторами судьбы раковых клеток. Их двойная роль предоставляет уникальную возможность для разработки новых терапевтических подходов, основанных на модуляции окислительно-восстановительного баланса.

1.6 Иод как биологически активный агент

Иод - это важный микроэлемент, традиционно ассоциируемый с функцией щитовидной железы; однако все больше данных свидетельствует о том, что он обладает широким спектром биологической активности, выходящей за рамки синтеза гормонов [65]. В последние годы иод привлекает все больше внимания как потенциальное противораковое средство благодаря своей способности

модулировать окислительно-восстановительный баланс, регулировать пролиферацию клеток и индуцировать апоптоз [66, 67].

Физиологическая роль иода

Иод играет фундаментальную роль в физиологии человека, прежде всего, благодаря своему участию в синтезе гормонов щитовидной железы, включая тироксин (Т4) и трииодтиронин (Т3). Эти гормоны регулируют ключевые метаболические процессы, такие как энергетический обмен, клеточная дифференциация, рост и развитие организма [68–71].

Однако в последние годы понимание биологической роли иода значительно расширилось. Помимо участия в эндокринной регуляции, иод считается биологически активным веществом с выраженными экстратиреоидными эффектами. Было показано, что различные химические формы иода участвуют в регуляции окислительно-восстановительного баланса, модулируют иммунные реакции и влияют на пролиферацию, дифференцировку и гибель клеток. Особый интерес представляет молекулярный иод (I_2), поскольку его биологические эффекты отличаются от эффектов иодида (I^-): он по-разному распределяется в организме, относительно менее активно абсорбируется щитовидной железой и способен непосредственно воздействовать на периферические ткани [66].

На клеточном уровне иод участвует в окислительно-восстановительных реакциях и способствует регуляции окислительного баланса. Было показано, что он действует и как антиоксидант, и как прооксидант, в зависимости от его концентрации и химической формы [72]. Одним из механизмов антиоксидантного действия иода является его участие в реакциях с органическими пероксидами:

$$R\text{-}OOH + 2H^+ + 2I^- = R\text{-}OH + H_2O + I_2 \quad (1)$$

где, R – радикал органического пероксида.

Образующийся молекулярный иод (I_2) может быть восстановлен, например, тиолами, или включен в органические соединения (остатки тирозина или липиды) [72].

Двойственное окислительно-восстановительное поведение лежит в основе многих его биологических эффектов и особенно актуально при патологических состояниях, включая рак [73–75].

Помимо своих эндокринных функций, иод участвует в регуляции иммунитета и механизмах клеточной защиты. Это позволяет рассматривать иод не только как микроэлемент, необходимый для метаболизма щитовидной железы, но и как потенциальный регулятор клеточного метаболизма, иммунного ответа и противоопухолевых механизмов. Исследования показали, что иод может модулировать воспалительные реакции и влиять на клеточные сигнальные пути, связанные с пролиферацией и апоптозом [74, 76].

Противораковые эффекты иода

Недавние исследования показали, что иод проявляет значительную противораковую активность в различных моделях опухолей. Эти эффекты опосредуются множественными механизмами, включая индукцию апоптоза, модуляцию ядерных рецепторов и образование биоактивных иодированных липидов, а также модуляцию противоопухолевого иммунного ответа [74, 77].

Особенно важно отметить, что противоопухолевое действие молекулярного иода часто более выражено в трансформированных клетках, чем в нормальных. Это может быть связано с метаболическими особенностями опухолевых клеток, повышенной выработкой активных форм кислорода (АФК), изменением функции митохондрий и нарушением антиоксидантных защитных механизмов. В результате дополнительный окислительно-восстановительный эффект, вызванный иодом, может привести к превышению опухолевыми клетками критического порога повреждения и активации запрограммированной клеточной смерти [78].

Индукция апоптоза

Одним из основных механизмов противораковой активности иода является индукция апоптоза. Было показано, что молекулярный иод активирует митохондриальные пути, увеличивает выработку АФК и способствует высвобождению цитохрома С, что приводит к активации каспаз и запрограммированной клеточной смерти.

Важно отметить, что индуцированный иодом апоптоз, по-видимому, более выражен в раковых клетках, чем в нормальных клетках, что может быть связано с изменением их окислительно-восстановительного баланса и повышенной восприимчивостью к окислительному стрессу. Ионы иода, высвобождаемые в микроокружении опухоли, которое характеризуется слабокислой реакцией и повышенным содержанием H_2O_2, могут участвовать в образовании молекулярного иода и трииодида. Этот процесс усиливает накопление активных форм иода в клетке и способствует развитию митохондриальной дисфункции. Таким образом, само микроокружение опухоли может способствовать превращению иодсодержащих соединений в более активные формы, оказывая цитотоксическое действие главным образом на опухолевую ткань [79].

Следует отметить, что АФК может активно взаимодействовать иод в форме иодидов. В кислой среде протекает реакция так:

$$H_2O_2 + 2I^- + 2H^+ = I_2 + 2H_2O \qquad (2)$$

Однако восстановительная активность иодид-ионов не ограничивается взаимодействием с перекисью водорода. Они эффективно вступают в реакцию со свободными радикалами ($O_2^{\bullet-}$, O_2, $HO_2^{\bullet}$), в том числе и газообразными [80, 81]. Благодаря высокой реакционной способности иодид-ионов данные реакции могут протекать без участия ферментативного катализа и рассматриваться как один из механизмов антиоксидантного действия иода [72, 82]. Этот механизм также является одним из источников 6-иодолактона - мощного активатора

апоптоза, в процессе которого иод выступает не только в роли антиоксиданта, но образует биологически-активные дериваты липидов [6, 65, 74].

Таким образом, молекулярный иод в организме может выступать в качестве пролекарства, которое через ряд метаболических превращений образует активное соединение [6, 83]. Аналогичный подход реализован в химиотерапии туберкулеза. Поскольку изониазид, этамбутол и пиразинамид не являются антибиотиками в классическом понимании. Их действие имеет специфичность в отношении некоторых представителей рода Micobacterium, и связано с метаболическим превращением и образованием активных веществ внутри *Micobacterium tuberculosis* [84, 85]. Комбинация противоопухолевой терапии с активаторами апоптоза может быть одним из новых подходов в химиотрапии рака. Среди активаторов апоптоза могут быть иод-производные липидов и гетероциклических соединений.

Активация PPARγ

Иод и его производные могут активировать рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом гамма (PPARγ), ядерный рецептор, участвующий в регуляции клеточной дифференцировки, метаболизма липидов и апоптоза [67, 86, 87].

Активация PPARγ связана с ингибированием роста опухолей, индукцией дифференцировки и подавлением пролиферации при различных типах рака. Молекулы, производные иода, в частности иодированные липиды, действуют как лиганды для PPARγ, связывая метаболизм иода с транскрипционной регуляцией противораковых путей [6, 88].

Этот механизм представляет собой важный негенотоксический путь, посредством которого иод оказывает свое противоопухолевое действие.

Иодированные липиды и иодолактоны

Ключевым аспектом биологической активности иода является его способность образовывать иодированные производные липидов мембран посредством взаимодействия с полиненасыщенными жирными кислотами [89].

Иодирование может происходить через раскрытие двойной углеродной связи, например, в 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолине (рисунок 5).

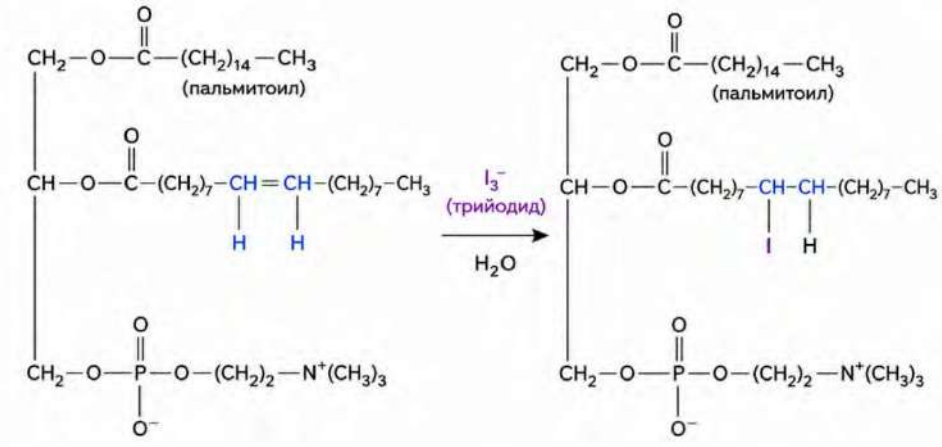


Рисунок 5 – Схема иодирования 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (адаптировано по [89])

Также, при иодировании липидов образуется - 5-гидрокси-6-иодо-8,11,14-эйкозантионовая кислота или 6-иодолактон (6-IL), которые синтезируются из арахидоновой кислоты, функционируют как значимые индукторы апоптоза в неопластических клетках (рисунок 6) [89–92].

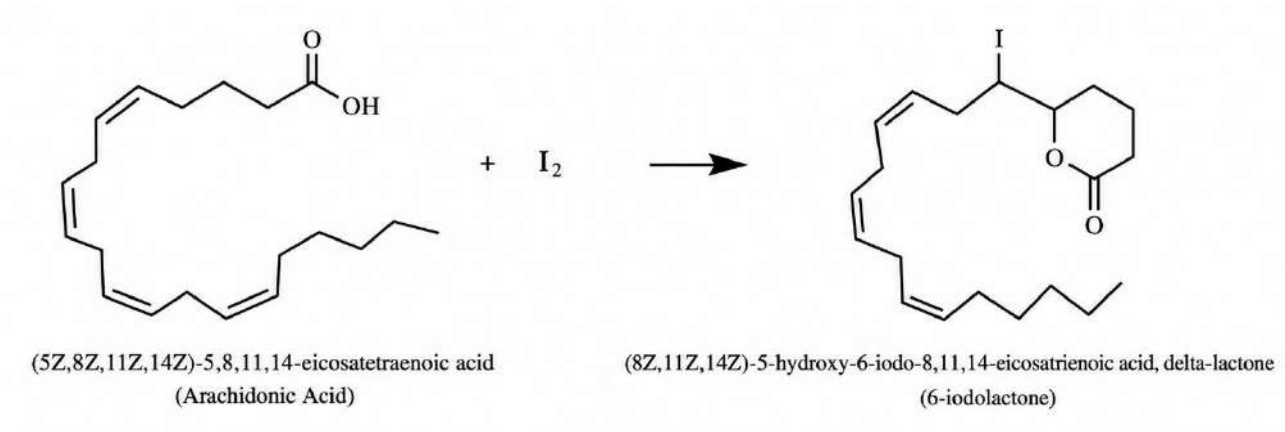


Рисунок 6 – Образование 6-иодолактона из арахидоновой кислоты (адаптировано по [89])

Экспериментально показано, что 6-иодолактон обладает мощными антипролиферативными и проапоптотическими свойствами. Иодолактоны действуют как сигнальные молекулы, модулирующие экспрессию генов, функцию митохондрий и окислительный стресс. Считается, что они играют центральную роль в опосредовании противораковых эффектов иода [78]. Недавние исследования подчеркивают, что эти иодированные липиды могут представлять собой фактические биоактивные формы, ответственные за терапевтические эффекты иода [78, 89].

Также, ненасыщенные жирные кислоты, образуя химические связи с иодом с помощью процессов иодолактонизации, могут влиять на метаболические клеточные ответы и экспрессию генов [86, 93, 94].

В литературе описываются биологические свойства 6-IL – способность проявлять антипролиферативный эффект за счет блокирования митогенных путей и индуцирования апоптоза [89, 90, 95]. 6-IL, являясь лигандом PRAP gamma рецептора, который, в свою очередь, является транскрипционным фактором, принадлежащим к суперсемейству ядерных рецепторов, вовлекается в метаболизм липидов, гомеостаз, дифференциацию, апоптоз и ассоциируется с позитивными и негативными эффектами карциногенеза в различных тканях [86, 96–98].

Образование может происходить, как напрямую, путем иодирования молекулярным иодом используемых лекарственных средств, так и через систему взаимодействия АФК и иодидов [89]. Схожие соединения иода с нафтохинонами - 3-иод-α-лапахон и 3-иод-β-лапахон также вызывают продукцию АФК и идуцируют апоптоз опухолевых клеток, а также приводят к уменьшению размера опухоли в исследованиях *in vivo* [99, 100].

Иод как адъювант противоопухолевой терапии

Возможность использования молекулярного иода в качестве адъювантного компонента противоопухолевой терапии заслуживает особого внимания. Молекулярный иод в комбинации с метрономной химиотерапией циклофосфамидом снижает рост опухоли в модели рака молочной железы у крыс и одновременно уменьшает некоторые проявления токсичности, включая потерю массы тела и механизмы геморрагического цистита. Также отмечается снижение экпресии VEGF и Survivin, что указывает на возможное влияние иода на ангиогенез и механизмы выживания опухолевых клеток [77]. Эти данные подтверждают многообещающие перспективы дальнейшего изучения иодсодержащих соединений не только как самостоятельных противораковых агентов, но и как потенциальных модификаторов, способных изменять эффективность стандартной терапии. Сочетание соединений, способных активировать апоптоз, нарушать функцию митохондрий и снижать устойчивость опухолевых клеток к окислительному стрессу, с противоопухолевыми препаратами можно рассматривать как один из перспективных подходов к повышению эффективности химиотерапии.

Таким образом, имеющиеся данные позволяют рассматривать иод как биологически активное вещество с многоуровневым механизмом действия. Его противоопухолевая активность связана не только с прямым воздействием на окислительно-восстановительный баланс, но и с образованием биоактивных иодированных липидов, активацией PPARγ, нарушением митохондриального гомеостаза, индукцией апоптоза и модуляцией противоопухолевого иммунного ответа [77]. Эти свойства обосновывают актуальность дальнейших исследований иодсодержащих соединений, включая координационные комплексы и молекулярные формы иода, в качестве потенциальных компонентов противоопухолевой терапии.

1.7 Общая характеристика координационных соединений иода

В современной фармацевтической науке особое значение придается поиску и разработке новых лекарственных средств, которые способны проявлять выраженную терапевтическую активность. Актуальность данного направления связана с необходимостью расширения арсенала препаратов, обладающих широким спектром действия и перспективных для дальнейшего внедрения в медицинскую практику. Отдельным направлением в разработке лекарственных средств выделяются комплексные соединения, где неорганичексие ионы координируются органическими лигандами [101].

Одним из направлений, представляющих интерес для современной фармацевтической науки, является разработка биологически активных координационных соединений, содержащих молекулярный иод, и последующее создание их лекарственных форм [102]. Интерес к данной группе веществ обусловлен особенностями химического поведения иода, его способностью образовывать комплексы различного состава, а также возможностью получения соединений с выраженной биологической активностью. В медицинской

практике иодсодержащие препараты представлены как индивидуальными химическими соединениями, так и комплексами, или аддуктами, в которых иод может находиться в свободном либо связанном состоянии. По своей природе такие соединения часто рассматриваются как донорно-акцепторные комплексы с переносом заряда [103]. Формирование подобных комплексов характерно для галогенов, прежде всего для иода, а также для некоторых ионных систем. Однако важной особенностью этих соединений является их химическая лабильность, вследствие чего возникают трудности, связанные с обеспечением стабильности состава, воспроизводимости свойств и сохранности структуры аддуктов при хранении и разработке лекарственной формы [104]. Такие соединения образуются в тех случаях, когда группа атомов или молекулы выступают в роли донора и акцептора электронов. При этом чаще всего происходит перенос заряда от одного атома к другому (перенос заряда или ПЗ). Такой комплекс может быть обнаружен по изменению спектра между индивидуальными веществами и их комплексом. Практически всегда это происходит в видимой части спектра, и наблюдается изменение окраски изучаемых растворов. Подобные комплексы, как правило, не могут быть выделены в твёрдом состоянии [73]. Наиболее типичным примером является комплекс иода с различными органическими молекулами. От природы растворителя зависит и цвет раствора. В неполярных средах растворы иода имеют фиолетовую окраску, водные растворы бесцветные или бурого и фиолетого цвета [73, 105, 106].

Каждому состоянию иода соответствует максимум поглощения (λmax), который, как известно, зависит от строения вещества. Поглощение энергии излучения в видимом и ближнем ультрафиолетовом диапазоне 300 - 400 нм характерно при переходе сигма и *nu* валентных электронов, переходе неспаренных электронов на свободные молекулярные орбитали с более высокой энергией, а также для других сопряженных систем [107]. Как было упомянуто ранее, иод в водных растворах образует полииодиды щелочных металлов KI_3 и KI_5. Это происходит за счёт образования гипервалентных связей в результате взаимодействия валентных 5s- и 5p- орбиталей иодида с частично заполненными p-орбиталями каждого атома в молекуле иода. В результате растворы приобретают окраску, от красного до тёмно-фиолетого, почти чёрного цвета. Однако между атомами иода в трииодиде длина связей неодинакова, и представляется в виде ассиметричного аниона I_3^- с линейной цепью, квадратной или кубической 3D решеткой [108, 109].

$$I–I–I^- \text{ (симметричный)}, \; I–I—I^- \text{ (асимметричный)} \qquad (3)$$

$$I•••I—I•••I \rightarrow I—I + 2I^- \qquad (4)$$

$$I—I•••I \bullet I—I \rightarrow 2[I—I] + I^- \qquad (5)$$

Вся эта система выглядит как строительные блоки, когда к иодиду присоединяется одна молекула иода по формуле: $mI_2+nI^- \rightarrow I_{(2m+n)}^{n-}$. В результате ассоциации I_3^- и I_2 образуется пентаиодид I_5 ($I_3^- \bullet I_2$), и так далее [109, 110].

В воде реакции между иодом и его производными протекают с разной скоростью, а лимитирующим фактором становится концентрация иодидов. Это взаимодействие можно описать девятью уравнениями [111]:

$I_2+H_2O \leftrightarrow HIO+I^-+H^+$ (гидролиз) (6)
$HIO \leftrightarrow OI^-+H^+$ (диссоциация) (7)
$I_2+I^- \leftrightarrow I_3^-$ (образование трииодида) (8)
$HIO + H^+ \leftrightarrow H_2OI^+$ (протонирование) (9)
$I_3^-+I_2 \leftrightarrow I_5^-$ (образование пентаиодида) (10)
$2I_3^- \leftrightarrow I_6^-$ (димеризация) (11)
$IO^-+I^-+H_2O \leftrightarrow HI_2O^-+OH^-$ (иодирование иодата) (12)
$HI_2O^- \leftrightarrow I_2O^-+H^+$ (диссоциация) (13)
$3HIO \leftrightarrow IO_3^-+2I^-+3H^+$ (диспропорционирование) (14)

Как видно, некоторые из них являются реакциями комплексообразования, другие диспропорционирования, а третьи – кислотно-основного равновесия. Многие из них зависят от концентрации ионов I^- и H^+. Все равновесия, наблюдающиеся в системе, иод-вода, изучены достаточно глубоко, и для них установлен ряд закономерностей:

- реакции 6-13 идут быстро, а реакция диспропорционирования (14) сравнительно медленнее и ее скорость сильно зависит от pH и концентрации иодид ионов;
- при pH меньшей или равной 6,0, в присутствии избытка иодидов в системе существуют только соединения иода I^-, I_2 и I_3^-;
- в отсутствии избытка иодидов, при pH > 8,0 более 90% окислительного потенциала системы иод-вода обусловлена соединением HIO;
- при повышении значений pH трииодид ион «высвобождает» молекулярный иод и наблюдается дальнейшее накопление HIO и при нейтральных значениях pH галогенирующими агентами являются именно данные соединения.

Эти свойства иода создают многообразие супрамолекулярной химии I_2, I^- и R–I в которых встречаются донорно-акцепторные и с переносом заряда комплексы, гидрофобное взаимодействие, галогеновые и водородные связи [112]. Всё это и определяет биологическую активность иода и его соединений.

Наиболее известным и широко используемым в медицине комплексом иода с поливинилпирролидоном является повидон-иод или ПВП-иод [113–116]. С помощью рентгеновской кристаллографии и ИК-спектроскопии было сделано предположение о структуре ПВП-иода с формулой: $[(C_6H_9NO)_{18} \bullet HI_3]_n$, которая в настоящее время и используется в справочных источниках [117]. Позже другие исследования показали, что, во-первых, водородные связи в структуре ПВП-иод были представлены не корректно, а во-вторых, I_3^- не взаимодействует ни с протоном, ни с карбонильным кислородом [118].

Проведенные исследования физико-химических свойств координационных соединений показали, что для полноценного исследования систем, содержащих

комплексное соединение иода, необходимо использовать наиболее чувствительные методы и методики испытаний. Для оценки природы химической связи, подтверждения комплексообразования и характеристики основных физико-химических параметров иодсодержащих соединений могут использоваться спектрофотометрические методы в УФ-видимой области, ИК-спектроскопия, а также методы термического анализа, позволяющие регистрировать тепловые эффекты и оценивать стабильность исследуемых систем [119].

1.8 Применение координационных соединений иода в фармации

Галогенсодержащие препараты занимают устойчивое место в медицинской и фармацевтической практике благодаря выраженной биологической активности и широкому спектру противомикробного действия. Особое значение среди них имеют иодсодержащие соединения, включая препараты на основе трииодида, которые применяются как эффективные антисептические и бактерицидные средства [120, 121]. Антимикробное действие иода связано с его способностью вступать в окислительные реакции с функциональными группами аминокислот бактериальных белков, в том числе SH-, NH_2- и OH-группами. В первую очередь воздействию подвергаются ферментные системы и трансмембранные белки микроорганизмов. Окислительная модификация таких белков сопровождается изменением их пространственной структуры, что приводит к утрате каталитической и ферментативной активности. Быстрое развитие бактерицидного эффекта при применении иодсодержащих средств снижает вероятность адаптации микроорганизмов и формирования устойчивых форм [116, 122].

Растворимость иода является важнейшей функциональной характеристикой, отражающей природу взаимодействия в растворах, имеющей большое значение при выборе растворителя для осуществления химической реакции [123]. В данном случае растворимость молекулярного иода в воде невысока и составляет около $1{,}33\times10^{-3}$ моль/л, однако она значительно возрастает в присутствии иодид-ионов за счет образования полииодидных форм. Данное свойство имеет принципиальное значение при создании иодсодержащих лекарственных систем, поскольку растворимость и форма существования иода в растворе во многом определяют его химическую активность, стабильность и биологическое действие.

Иод способен образовывать аддукты с различными органическими соединениями и полимерными матрицами. Так, при взаимодействии иода с нейлоном-6 при нагревании до 145°C образуются аддукты, содержащие 70 - 90% иода. Такие системы характеризуются электропроводностью в диапазоне от 10^{-7} до 10^{-3} См/см при 25°C, причем увеличение содержания иода сопровождается повышением электрической проводимости. Похожие полупроводниковые аддукты могут формироваться и с другими полиамидами. Данные ИК- и ЯМР-спектроскопии свидетельствуют о выраженных структурных изменениях

нейлона-6 при образовании иодсодержащего аддукта, что связывают с формированием фрагментов типа –C=N$^+$H– [124].

В клинической практике важное место занимают также радиоактивные изотопы иода, прежде всего ^{123}I и ^{131}I. Радиоизотопные методы используются для оценки поглощения иода и функционального состояния щитовидной железы, тогда как ^{131}I применяется также для радиойодтерапии заболеваний щитовидной железы [125]. Использование радиоактивного иода в диагностике связано с его способностью избирательно накапливаться в щитовидной железе. Терапевтический эффект связан с повреждающим действием излучения радиоизотопов на клетки железы, участвующие в синтезе тиреоидных гормонов.

В органическом синтезе широкое применение получили соединения гипервалентного иода, которые рассматриваются как универсальные, эффективные и относительно устойчивые реагенты. Особое внимание уделяется псевдоциклическим гипервалентным производным иода, в которых дополнительная внутримолекулярная нековалентная координация в области иодного центра приводит к изменению физико-химических свойств соединений. По сравнению с обычными гипервалентными иодными реагентами такие производные часто обладают более высокой термической стабильностью, лучшей растворимостью и повышенной реакционной способностью [126, 127]. В последние годы псевдоциклические гипервалентные иодные реагенты все чаще используются в органическом синтезе в качестве экологически чистых селективных окислителей и электрофилов [128].

Препараты иода применяют наружно и внутрь. При наружном применении они выступают в качестве обеззараживающих, раздражающих и отвлекающих средств при воспалительных заболеваниях кожи и слизистых оболочек. Внутреннее применение препаратов иода традиционно связывают с профилактикой и лечением эндемического зоба, а также с рядом других показаний, включая хронические воспалительные процессы дыхательных путей, атеросклероз, третичный сифилис и хронические интоксикации соединениями ртути и свинца [129]. Несмотря на длительную историю применения, иодсодержащие препараты сохраняют актуальность благодаря доступности, сравнительно низкой стоимости и выраженному лечебно-профилактическому потенциалу [130].

Иодсодержащие бактерицидные композиции применяются в качестве бактерицидов в различных областях промышленности, в частности, при консервировании пищевых продуктов, в том числе овощей и фруктов, в фармацевтической промышленности и других областях [131–133]. Разработаны быстродействующие стерилизующие композиции, активные в отношении бактерий, спор, грибов и вирусов на различных поверхностях [134–136]. Такие антимикробные системы характеризуются широким спектром действия и могут проявлять более стабильную биоцидную активность по сравнению с традиционными соединениями четвертичного аммония, включая соли бензалкония. Дополнительными преимуществами является низкая токсичность и быстрое действие в небольших концентрациях.

В современной медицинской практике наиболее широко применяются комплексы иода с органическими макромолекулярными лигандами. К ним относятся иодофоры, в которых лигандами могут служить поливинилпирролидон (ПВП-иод или PVP-I), поливиниловый спирт и полисахариды [111, 137]. Координированный иод органическими макромолекулярными лигандами, проявляет стабильность и меньшую токсичность [138], чем растворы молекулярного иода с иодидом калия [139]. Это делает иодофоры удобными для практического применения, особенно в случаях, когда требуется контролируемое высвобождение активного иода.

Рост устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам, включая карбапенемы и колистин, существенно ограничивает возможности современной противоинфекционной терапии [140]. В связи с этим поиск новых подходов к лечению лекарственно-устойчивых инфекций остается одной из актуальных задач фармацевтической науки [141]. В настоящее время, иодсодержащие соединения представляют практический интерес, поскольку иод сохраняет выраженные противомикробные свойства и обладает низкой вероятностью формирования устойчивости у микроорганизмов [142, 143]. В медицине и ветеринарии широкое распространение получили препараты, содержащие комплексы иода с органическими макромолекулами, включая повидон-иод и кадексомеры [144–146].

Наряду с антимикробным действием некоторые комплексы иода проявляют иммуномодулирующие свойства. Так, показано, что комплексы иода с декстраном способны повышать экспрессию IL-1β, IL-8, TNF-α и VEGF mRNA и не влияют на IL-6, IL-10, IL-12 и bFGF mRNA, что указывает специфическое иммунотропное действие [147]. В тоже время, их использование ограничено относительно высокой химической активностью и токсичностью этого комплекса [148]. Один из подходов к снижению токсичности является связывание иода с углеводными матрицами, в том числе с образованием комплексов с декстрином и кадексомерами. Сравнительное исследование различных комплексных соединений иода на сосуды хорионаллантоисной оболочки куриных эмбрионов показало, что повидон-иод в концентрации 1% характеризуется сильной раздражающей активностью, тогда как кадексомер в концентрации до 1,8% обладал умеренной активностью при экспозиции в течение 60 минут [149].

Несмотря на широкий спектр биологической активности иода и его комплексов, их практическое использование требует учета стабильности, реакционной способности и потенциальной токсичности [150]. По данным опубликованных клинических наблюдений, при острых отравлениях иодсодержащими препаратами летальные исходы регистрировались при поступлении иода в дозах порядка 17 - 120 мг/кг [151]. Поэтому при разработке новых иодсодержащих лекарственных средств особое значение имеют способы стабилизации активного иода, снижение его токсического действия и обеспечение воспроизводимости состава.

Установлено, что лекарственное средство аддукта иода оказывает влияние на популяционный состав бактерий морских свинок. В частности, увеличивает генетическую гетерогенность *Mycobacterium tuberculosis*, но без развития лекарственно-устойчивых форм [152]. Ранее *in vitro* и на экспериментальных животных было показано, что комплексы иода с полипептидами и декстрином, в комбинации с доксорубицином проявляют противоопухолевую активность [153].

Для установления строения иодсодержащих координационных соединений важное значение имеют квантово-химические методы моделирования. В ряде исследований структуры таких соединений изучались с использованием квантово-химических расчетов, а достоверность предложенных моделей оценивалась на основании данных спектрального и рентгеноструктурного анализа для соединений аналогичного класса [154].

Для установления строения иодсодержащих координационных соединений важное значение имеют квантово-химические методы моделирования. Кандидат химических наук Юлдашевой Г.А., АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» проведены квантовохимические расчеты взаимодействия молекулярного иода, галогенидов лития с органическими лигандами. Проведенные квантово-химические расчеты взаимодействия молекулярного иода и галогенидов лития с органическими лигандами позволили предложить наиболее вероятную структуру комплекса, в которой катионы лития поляризуют трииодид с последующим формированием комплекса дилитий(I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид [155–157]. Общая схема такого комплекса может быть представлена в следующем виде (рисунок 7).

Иод реализует свою биологическую активность преимущественно через окислительные механизмы, воздействуя на ключевые клеточные структуры, такие как мембранные липиды и белки, что приводит к повреждению микробных мембран, денатурации белков и ингибированию метаболизма [158]. Так, иод демонстрирует эффективность в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов, включая полирезистентные штаммы [159]. Но, также могут образовываться нековалентные связи между трииодидом и составными частями биоомолекул, например аминокислотой белков: [(alanine)]Kation$^{+}\cdot I_3^{-}$. В качестве противоиона могут выступать щелочные металлы – Li, Na и K. При этом литий обладает преимуществом зачёт малого ионного радиуса и сильных поляризующих свойств в отношении молекулярного иода [154]. В результате окислительная активность может быть уменьшена.

В свою очередь литий также часто используется в качестве стабилизирующего агента в фармацевтических препаратах благодаря его способности снижать скорость деградации действующих веществ и пролонгировать их действие. Кроме того, литий обладает способностью модулировать клеточные процессы и выступает в роли стабилизатора мембран, нарушая нормальное функционирование бактериальных клеток [160–164].

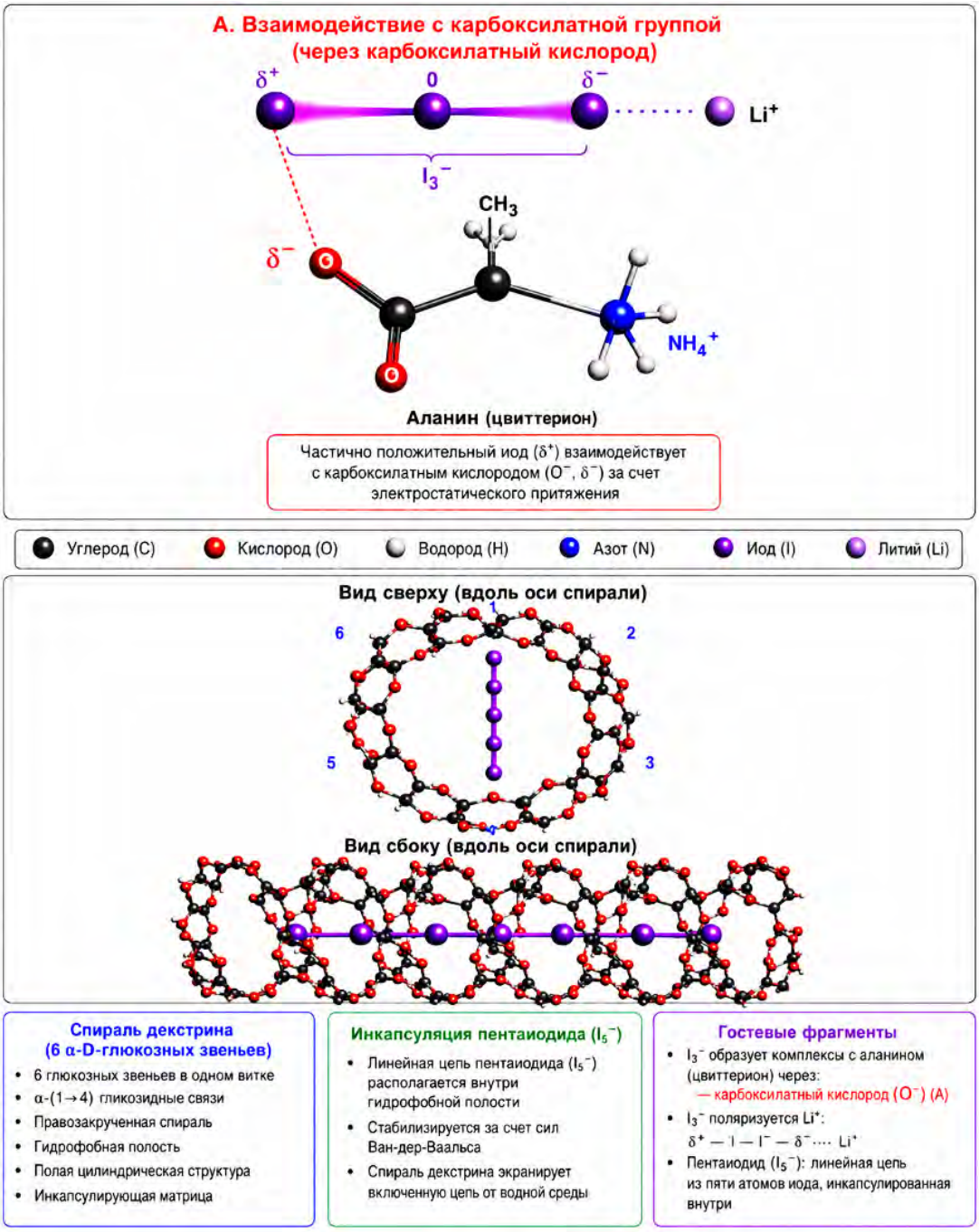


Рисунок 7 – Вероятная модель образования комплекса дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид

Декстрин эффективно инкапсулирует некоторые формы иода, предотвращая их преждевременное разрушение в биологических системах, тем самым обеспечивая химическую стабильность и фармакологическую доступность препарата [9, 165–167].

Рациональный выбор иода, лития, декстрина и полипептидов в качестве компонентов многокомпонентной терапевтической системы основан не только на их индивидуальной биоактивности, но и на их способности к синергической интеграции в комплекс за счет диполь-дипольных взаимодействий и

поляризации молекулы иода, с одной стороны, а с другой – управляемая его окислительная активность. Трииодидные и другие иодсодержащие формы рассматриваются как биологически активные компоненты комплекса, тогда как декстрин, полипептидные компоненты и ионы лития участвуют в формировании и стабилизации комплексной системы [168,169].

Таким образом, предлагаемый к исследованию комплекс дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид по сути является пролекарством. Координация полииодидов декстрином и полипептидами обеспечивает стабильность, сниженную окислительную активность и длительность высвобождения иода в организме. Избирательная чувствительность нормальных и опухолевых клеток к окислительному стрессу позволяет получить новое средство для неоадъювантной терапии рака путем активации апоптотической смерти клеток с дальнейшим воздействием цитостатическими препаратами. При этом достигается снижение вероятности развития резистентности, так как иод может взаимодействовать с продуцируемыми в раковой клетке реактивных форм кислорода с последующей химической модификацией белков и липидов. Образующиеся иодированные производные липидов являются индукторами апоптоза.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Координационное соединение иода

Объектом исследования являлось координационное соединение иода, дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид «КС-144», синтезированный в г.Алматы, Казахстан, АО «НЦПП», лаборатории физической и биоорганической химии согласно процедуре, описанной в патенте на изобретение №35927 от 28.10.2022 «Координационное соединение дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид, обладающее противоопухолевым действием» (Приложение А).

Реагенты для синтеза координационного соединения иода

Для синтеза были использованы следующие реагенты, аналитической чистоты, полученные из коммерческих источников без дополнительной очистки: картофельный крахмал (АО «Рогозницкий крахмальный завод», Беларусь, 98%), декстрин (Sigma-Aldrich, Германия), иодид калия (Sigma-Aldrich, Германия, ≥98%), иод (G. Amphray Lab., Индия), соляная кислота (Sigma-Aldrich, Германия, 37%), хлорид лития (Sigma-Aldrich, Германия, ≥99%), очищенная вода (система очистки воды UltraClear TWF, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Германия), тиосульфат натрия, нитрат серебра, азотная кислота (фиксанал), (Уралхиминвест, Россия), стандартные буферные растворы для pH-метра (Reagecon Diagnostics Ltd., Ирландия).

Референтные вещества

В исследовании использовали следующие противоопухолевые вещества: цисплатин дигидрохлорид (C2210000, Sigma-Aldrich, США) и доксорубицин гидрохлорид (D1515, Sigma, США).

В качестве контрольного вещества использовали иод повидон (ПВП-иод) (DOSFARM, Казахстан).

Контролем для микроядерного теста являлись: Митомицин С (M0503, Sigma-Aldrich, США) и Циклофосфамид (CPA) (C0768, Sigma-Aldrich, США).

В качестве стандартного образца иодид-ионов использовали государственный стандартный образец ГСО 9426-2009 (Санкт-Петербург).

Культуры опухолевых клеток

Основная клеточная линия, использованная в работе - клетки злокачественной плевральной мезотелиомы P31 и их цисплатин-резистентная сублиния P31res1.2, любезно предоставленные профессором K. Grankvist, Umea University, г. Умео, Швеция.

Для скрининга использовали следующие линии клеток: AGS (аденокарцинома желудка человека, ATCC-CRL-1739, США), MiaPaCa2 (панкреатическая карцинома, ATCC-CRL-1420, США), HepG2 (гепатоцеллюлярной карциномы печени человека, ATCC-HB-8065, США), HeLa

(клетки аденокарциномы шейки матки человека, ATCC-CCL-2, США), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы, ATCC-HTB-22), ZR-75-1 (карцинома молочной железы, ATCC-CRL-1500, США), K562 (эритробластоидная лейкемия человека, ATCC-CCL-243, США), Raji (Burkitt`s лимфома, ATCC-CCL-86, США) и L5178Y TK+/- clone (3.7.2C) (лимфома мыши, ATCC-CRL-9518, США).

Контрольные клеточные линии MDCK (Madin Darbin Canin Kidney, эпителиальные клетки почки собаки, Лаборатория клеточной биотехнологии, Россия) и МеТ-5А (SV40 Tag - иммортелизованые клетки мезотелиомы, ATCC-CRL-9444, США).

В моделировании рака легкого крыс использовали клеточную линию органотропного лекарствено-устойчивого штамма аффинитетной опухоли (карциномы) яичника крыс (АфОЯ), полученного из КазНИИ онкологии и радиологии (г. Алматы, Казахстан) [170].

Микроорганизмы

Для проведения бактериального теста Эймса (тест обратных мутаций) использовали стандартный набор музейных тест-штаммов грамотрицательных бактерий *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli*, рекомендованный Руководством ОЭСР № 471 для оценки мутагенной активности химических [171]. В исследование были включены штаммы *S. typhimurium* TA1535 (ATCC 29629, США), *S. typhimurium* TA1537 (ATCC 29630, США), *S. typhimurium* TA98 (NBRC 14193, NITE, Япония), *S. typhimurium* TA100 (NBRC 14194, NITE, Япония), а также штамм *E. coli* WP2 uvrA/trp (ATCC 49979, США).

Лабораторные животные

В *in vivo* экспериментальных исследованиях использовались самки крыс линии Wistar возрастом 6 - 8 недель в количестве 70 особей, содержавшиеся в условиях SPF-вивария. Эксперименты на лабораторных животных проводили в соответствии с руководящими принципами Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета ЕС о защите животных, используемых в научных целях, Протоколы исследования № 14/1 и № 14/2 от 01.04.2019 был одобрен Комиссией по биоэтике АО «НЦПП» (Приложение Ж и Приложение И).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Квантовохимическое моделирование соединения *in silico*

Квантово-химическое моделирование активных центров координационных соединений иода, оптимизация геометрии и расчеты энергии образования исследуемой структуры выполняли с использованием метода теории функционала плотности (DFT) с функционалом B3PW91 (Уоллингфорд, Коннектикут, США). Вычислительная модель включала полисахаридно-пептидный фрагмент, ион Li^+ и частицу соединения йода I_3^- или I_2Cl^-. Вычисления проводили на суперкомпьютере Fujitsu PRIMERGY BX920 S1 (Fujitsu, Токио, Япония) в Казахском национальном исследовательском техническом университете имени Сатпаева с пиковой производительностью 10.9

TFLOPS [155, 172]. Квантово-химические расчеты и моделирование выполнены при научно-методическом участии к.х.н. Юлдашевой Гульнар Абдрашидовной. Координационные соединенения иода были синтезированы по методу, описанному в патенте [173].

Энергия образования комплекса рассчитывалась по следующей формуле:

$$\Delta E = E1\ total - (E2\ total + E3\ total + E4\ total), \quad (15)$$

где, E1 total – полная энергия комплекса;
E2 total – полная энергия декстриновой спирали с полипептидом;
E3 total – полная энергия иона Li^+;
E4 total – полная энергия иона I_3^- или I_2Cl^-.

2.2.2 Синтез иодсодержащего комплекса

Получение иодсодержащего комплекса КС-144 проводили на основе полисахаридно-пептидной матрицы с использованием

Получение иодсодержащего комплекса КС-144 проводили на основе полисахаридно-пептидной матрицы с использованием иодида калия, молекулярного иода и хлорида лития. В качестве органических компонентов использовали декстрин и гидрализат альбумина. Концентрации компонентов в реакционной смеси составляли: KI - 10 г/л, I_2 - 8 г/л, LiCl - 4 г/л, декстрин - 130 г/л, альбумин - 33 г/л.

В качестве исходных реактивов использовали вещества квалификации не ниже «х.ч.» или «ч.д.а.» с учётом требований нормативных документов на соответствующие реактивы. Молекулярный иод применяли согласно требованиям ГОСТ 4159-79, иодид калия согласно ГОСТ 4232-74. Приготовление иод-иодидного раствора осуществляли с учётом способности молекулярного иода растворяться в растворах щелочных иодидов с образованием трииодидных и полииодидных форм.

Подготовка очищенной воды. Для получения очищенной воды использовали систему, состоящая из установок механического фильтра BWT A 5310, угольной фильтр AKF 300, ионообменной колонки Rondomat E 50 DWZ, обратного осмоса UO 150 и ультрафиолетовой дезинфекции Bwades 58C (Германия). Качество очищенной воды контролировали по электропроводности, общему содержанию органического углерода и микробиологическому загрязнению. Согласно спецификации, электропроводность воды при температуре 20°C не превышала 1,1 мкСм/см, общее содержание органического углерода не превышало 0,5 мг/л, а уровень микробного загрязнения не превышал 50 КОЕ/мл.

Приготовление раствора декстрина. Раствор декстрина готовили на очищенной воде. В плоскодонную стеклянную колбу вносили рассчитанный объем воды, после чего при постоянном перемешивании постепенно добавляли навеску декстрина до конечной концентрации 130 г/л. Смесь перемешивали до получения однородного раствора без видимых нерастворенных частиц. При

необходимости раствор выдерживали при умеренном нагревании и постоянном перемешивании для более полного растворения полисахаридного компонента. Полученный раствор декстрина использовали на последующем этапе получения КС-144.

Приготовление гидролизата альбумина. В качестве исходного белкового сырья использовали альбумин. Навеску альбумина, соответствующую концентрации 33 г/л, растворяли в очищенной воде при постоянном перемешивании до получения однородного раствора. Полученный раствор подвергали кислотному гидролизу с использованием 6N HCl при температуре 100°C в течение 20 ч в герметичных условиях, часто с предварительным удалением кислорода или созданием азотной атмосферы. После завершения гидролиза реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и доводили pH до 7,2. Полученный гидролизат альбумина использовали в качестве органического полипептидного компонента при получении координационного соединения иода.

Приготовление раствора трииодида лития. Иод-иодидный раствор готовили в стеклянной колбе. В рассчитанном объеме очишенной воды растворяли иодид калия до конечной концентрации 10 г/л. После полного растворения KI в раствор постепенно добавляли молекулярный иод до концентрации 8 г/л согласно требованиям ГОСТ 4159-79 [174]. Смесь перемешивали до равномерного распределения иода и формирования окрашенного иод-иодидного раствора. В присутствии иодид-ионов молекулярный иод находился в равновесии с трииодидными и другими полииодидными формами, которые в дальнейшем участвовали в комплексообразовании.

Приготовление раствора хлорида лития. Раствор хлорида лития готовили отдельно. Навеску LiCl, соответствующую концентрации 4 г/л, взвешивали на аналитических весах с точностью ±0,001г, затем растворяли в очищенной воде при постоянном перемешивании до полного растворения соли. Полученный раствор использовали как источник ионов лития, участвующих в стабилизации и поляризации иодсодержащих фрагментов в составе координационной системы.

Смешивание компонентов. Приготовленные растворы компонентов смешивали последовательно при непрерывном перемешивании. Сначала смешивали растворы декстрина и альбумина до получения однородной полисахаридно-белковой основы. Затем к полученной смеси постепенно добавляли иод-иодидный раствор, обеспечивая равномерное распределение иодсодержащих компонентов в объеме реакционной среды. После этого в реакционную смесь вносили раствор хлорида лития. Смешивание проводили постепенно, чтобы предотвратить образование локальных зон с повышенной концентрацией реагентов и обеспечить более равномерное протекание процессов комплексообразования.

В процессе объединения компонентов происходило формирование иодсодержащего аддукта, в котором полисахаридная матрица декстрина и

белковый компонент создавали условия для удержания и стабилизации полииодидных фрагментов. Ионы лития при этом могли участвовать в дополнительной стабилизации и поляризации иодсодержащей системы. В результате объединения компонентов был получен КС-144 в виде однородной окрашенной системы в жидком состоянии.

Получение сухой субстанции КС-144. После завершения смешивания полученную жидкую форму КС-144 переносили в предварительно подготовленную емкость и помещали в эксикатор с хлоридом кальция, использованным в качестве осушающего агента. Удаление воды проводили путем медленного испарения растворителя до образования сухого продукта. Полученную сухую субстанцию КС-144 использовали для последующей физико-химической характеристики и исследования стабильности.

2.2.3 Фармацевтические показатели качества КС-144

Физико-химические и фармацевтические показатели качества субстанции КС-144 оценивали с использованием комплекса фармакопейных и физико-химических методов анализа с учетом принципов руководства ICH Q8(R2) «Pharmaceutical Development». В ходе исследования определяли описание субстанции, растворимость, pH водного раствора, температуру плавления/разложения, потерю в массе при высушивании, кинематическую вязкость, относительную плотность, микробиологическую чистоту, а также проводили идентификацию и количественное определение иода, иодида и суммарного содержания иода.

Испытания выполняли в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Республики Казахстан [175] и Европейской фармакопеи [176]. Исследования проводили на базе аккредитованных лабораторий АО «НЦПП»: лаборатории физической и биоорганической химии и испытательной лаборатории физико-химических методов исследования. Указанные лаборатории соответствовали требованиям ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

Органолептические параметры. Органолептические и визуальные характеристики субстанции оценивали согласно требованиям ГФ РК (том 1, раздел 2.3.4). Запах субстанции определяли органолептически. Цвет, внешний вид и однородность субстанции оценивали визуально при достаточном освещении; запах определяли органолептически. Данный этап использовали как первичную характеристику субстанции перед проведением последующих физико-химических испытаний.

Определение растворимости. Растворимость сухой субстанции КС-144 определяли в соответствии с требованиями ГФ РК (том 1, с. 25). Исследование проводили в очищенной воде, а также в ряде полярных и неполярных растворителей. Навеску субстанции последовательно смешивали с очищенной водой до получения прозрачного/однородного раствора. Растворимость

выражали как отношение массы субстанции к объему растворителя, необходимому для ее полного растворения.

Потенциометрическое определение pH. Значение pH определяли потенциометрическим методом согласно ГФ РК (том 1, раздел 2.2.3) на 1% водном растворе КС-144 с использованием ионометра Basic pH Meter PB-11 (Sartorius, Германия) и комбинированного электрода. Перед измерением прибор калибровали по стандартным буферным растворам, после чего проводили определение pH исследуемых образцов.

Идентификация по ИК спектру. Идентификацию субстанции методом инфракрасной спектроскопии проводили согласно ГФ РК (том 1, раздел 2.2.24). Инфракрасные спектры регистрировали в диапазоне частот от 4000 до 650 $см^{-1}$ с использованием ИК-Фурье спектрофотометра Nicolet 6700 (Thermo Scientific, США) в диапазоне волновых чисел 650 - 4000 $см^{-1}$. Сканирование проводили с использованием приставки Smart Performer методом нарушенного полного внутреннего отражения на кристалле ZnSe. Полученные спектры использовали для характеристики функциональных групп органической матрицы и оценки изменений полос поглощения, потенциально связанных с межмолекулярными взаимодействиями компонентов КС-144.

Идентификация по УФ спектру. Идентификацию методом УФ-видимой спектроскопии проводили согласно ГФ РК (том 1, раздел 2.2.25). Анализ выполняли на спектрометре UV-Vis Lambda-35 (Perkin Elmer, США) с использованием кварцевых кювет. Образцы растворяли в воде, а в качестве раствора сравнения использовали соответствующий растворитель. Сканирование проводили в диапазоне 190–900 нм [177]. Полученные спектры использовали для характеристики электронного поглощения и выявления спектральных признаков различных иодсодержащих форм.

Раман-спектроскопия. Раман-спектры сухой субстанции КС-144 регистрировали на спектрометре NT-MDT NTegra Spectra в Национальной нанотехнологической лаборатории открытого типа Казахского национального университета имени аль-Фараби (г. Алматы, Казахстан). В качестве источника возбуждения использовался полупроводниковый диодный лазер с длиной волны 473 - 514 нм. Полученные спектры использовались для характеристики иодсодержащих фрагментов в КС-144, главным образом в низкочастотной области спектра, и анализировались вместе с данными УФ-видимой и ИК-спектроскопии. Интерпретацию Раман-полос проводили с учетом опубликованных данных о спектральных характеристиках трииодида и высших полииодидных форм.

Определение температурного плавления/разложения. Температурный интервал плавления/разложения сухой субстанции КС-144 определяли открытым капиллярным методом в соответствии с требованиями ГФ РК (том 1, раздел 2.2.14). Измерение проводили на приборе для определения температуры плавления ПТП (М). Для каждого определения использовали 0,01 г сухой субстанции. Испытания проводили в трех параллельных определениях с последующей оценкой воспроизводимости полученных результатов.

Определение потери в массе при высушивании. Потерю в массе при высушивании определяли согласно ГФ РК (том 1, раздел 2.2.32). Навеску субстанции КС-144 массой 1,0 г помещали в предварительно взвешенный стеклянный бюкс и высушивали в сушильном шкафу при температуре 40°С в течение 5 ч. Взвешивание проводили через каждый час высушивания. После завершения высушивания рассчитывали потерю массы относительно исходной навески. Данный показатель использовали для оценки содержания влаги и летучих компонентов в исследуемой субстанции.

Определение кинематической вязкости. Кинематическую вязкость определяли с использованием стеклянного вискозиметра Оствальда при температуре 20°С в соответствии с требованиями ГФ РК (том 1, раздел 2.2.8). Испытания проводили на 1% водных растворах субстанции. Перед началом измерений раствор выдерживали до достижения заданной температуры, после чего фиксировали время истечения жидкости через капилляр вискозиметра.

Кинематическую вязкость рассчитывали по формуле:

$$\nu = k \times t \qquad (16)$$

где, ν – кинематическая вязкость, мм²/с;
k – постоянная вискозиметра, мм²/с²;
t – время истечения раствора субстанции, с.

Определение относительной плотности. Относительную плотность определяли согласно ГФ РК (том 1, раздел 2.2.5). Испытание проводили для водного раствора субстанции при контролируемой температуре. Полученные данные использовали для дополнительной физико-химической характеристики раствора и при расчетах, связанных с вязкостью и концентрационными параметрами.

Определение микробиологической чистоты. Микробиологическую чистоту субстанции определяли согласно ГФ РК (том 1, разделы 2.6.12 и 2.6.13). Испытания проводили для оценки соответствия субстанции требованиям, предъявляемым к микробиологическому качеству нестерильных фармацевтических субстанций. В ходе анализа определяли микробную обсемененность и проводили испытания на наличие отдельных видов микроорганизмов в соответствии с фармакопейными требованиями.

Количественное определение иодсодержащих компонентов. Количественное определение иодсодержащих компонентов, включая иодид-ионы, полииодидные формы и суммарное содержание иода, проводили методом капиллярного электрофореза в соответствии с требованиями ГФ РК (том 1, разделы 2.5.4 и 2.2.20), а также с учётом положений Европейской фармакопеи (раздел 2.2.47). Исследования проводили на приборе капиллярного электрофореза Agilent 1600 (Германия), оснащенном диодно-матричным детектором. Регистрацию и обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения 3D-CE ChemStation Rev. A.10.02 Agilent

Technologies. Для анализа использовали капилляр с внутренним диаметром 50 мкм и общей длиной 56 см. Диапазон длин волн прибора составлял от 190 до 600 нм.

В качестве стандартного образца иодид-ионов использовали государственный стандартный образец ГСО 9426-2009 (Санкт-Петербург). Концентрации аналитов в растворах образцов доводили до 5 мг/л. Перед введением в капилляр растворы фильтровали через мембраны с размером пор 0,2 мкм. Качественную идентификацию проводили путем сопоставления времени миграции исследуемых компонентов со временем миграции эталонных стандартов. Количественное определение выполняли по площади пика с использованием сертифицированных стандартных образцов. Воспроизводимость выходного сигнала оценивали по относительному среднеквадратичному отклонению: для времени миграции оно составляло не более 1%, для площади пика не более 4% [178].

2.2.4 Методы культивирования клеток

Работу с клеточными линиями выполняли в соответствии с паспортными характеристиками используемых клеточных линий и общепринятыми методами культивирования клеток млекопитающих, включая размораживание, поддержание культуры, пассирование, оценку жизнеспособности и криоконсервацию клеточного материала. Все манипуляции выполняли в асептических условиях с соблюдением требований стерильности и правил работы с культурами клеток.

Клеточные линии поддерживали в полной культуральной среде на основе RPMI-1640, содержащей L-глютамин (Sigma-Aldrich, США), раствор антибиотик-антимикотик (Antibiotic-Antimycotic Solution, AAS), включавший 10 000 Ед пенициллина и 10 мг стрептомицина на 1 мл (Sigma-Aldrich, США), а также 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки FBS (Sigma, США). Использование 10% полной культуральной среды (10% ПКС) обеспечивало необходимые условия для роста, сохранения метаболической активности и поддержания жизнеспособности клеток в процессе культивирования.

Клетки инкубировали при температуре 37°C в атмосфере с содержанием 5% CO_2. Пассирование клеточных линий проводили по мере достижения необходимой плотности роста культуры. Для промывания клеток использовали однократный сбалансированный солевой раствор Хэнкса HBSS (Sigma-Aldrich, США). Для отделения адгезивных клеток от поверхности культурального пластика применяли стерильный 0,25% раствор Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, США). После отделения клеток действие трипсина останавливали добавлением полной культуральной среды, содержащей сыворотку.

Перед постановкой экспериментов жизнеспособность клеток оценивали методом исключения трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Для дальнейших исследований использовали клеточные суспензии с жизнеспособностью не менее 90%, что позволяло снизить влияние исходной

гибели клеток на результаты анализа цитотоксичности и пролиферативной активности.

2.2.5 Определение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяли с использованием 0,4% раствора трипанового синего. Это стандартный метод количественной оценки жизнеспособности клеток, основанный на том, что живые клетки с неповреждённой мембраной исключают краситель, а погибшие клетки с нарушенной мембранной целостностью окрашиваются в синий цвет [179].

Для анализа 20 мкл клеточной суспензии смешивали с 20 мкл 0,4% раствора трипанового синего в соотношении 1:1. После осторожного перемешивания полученную смесь вносили в камеру Горяева и проводили микроскопический подсчёт общего количества клеток, а также числа окрашенных и неокрашенных клеток. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали, как отношение числа неокрашенных клеток к общему количеству подсчитанных клеток. В экспериментальную работу включали только клеточные суспензии с жизнеспособностью не менее 90%, что позволяло минимизировать влияние исходной гибели клеток на результаты последующих исследований цитотоксичности и пролиферативной активности.

2.2.6 Определение пролиферативной активности опухолевых клеток

Количественное определение клеточной пролиферации и цитотоксичности в образцах клеточных культур проводили с использованием коммерческого набора реагентов EZ4U (Biomedica, Австрия) на основе использования витального красителя. Опухолевые линии клеток лейкемии (K562), мезотелиомы (P31 и P31res1.2), молочной железы (MCF-7 и ZR-75-1) рассеивали в 96-луночные планшеты (BRAND plates, Германия) в концентрации 5×10^3 кл/яч в объеме 200 мкл полной питательной среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки предварительно инкубировали в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. После предварительной инкубации ростовую среду удаляли и вносили по 200 мкл полной питательной среды, содержащей исследуемое соединение КС-144 в диапазоне концентраций 0,8 - 2,0 мг/мл. В качестве препарата сравнения использовали ПВП-иод в концентрации 0,2 мг/мл. В ячейки отрицательного контроля вносили по 200 мкл питательной среды без добавления исследуемых веществ. Продолжительность воздействия исследуемых веществ составляла 24 ч. За 4 ч до окончания инкубации в каждую ячейку добавляли реагент EZ4U в количестве, соответствующем 10% от объёма среды в ячейке, после чего планшеты дополнительно инкубировали CO_2-инкубаторе, в зависимости от метаболической активации каждой клеточной лини. Оптическую плотность измеряли на микропланшетном ридере SynergyHT (BioTEK, США) при длине волны основного фильтра 450 нм с референсным фильтром 620 нм согласно адаптированному лабораторному протоколу. Значения $ЦТК_{50}$ рассчитывали с использованием программного обеспечения

GraphPad Prism 6 на основании анализа зависимости «концентрация-эффект» с учётом всего исследованного диапазона концентраций.

2.2.7 Анализ цитотоксичности МТТ методом

Цитотоксичность КС-144 при монотерапевтическом воздействии и в комбинации с противоопухолевыми препаратами оценивали с использованием колориметрического МТТ-метода. Метод основан на способности метаболически активных жизнеспособных клеток восстанавливать растворимую жёлтую тетразолиевую соль 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) до нерастворимых пурпурно-синих кристаллов формазана за счёт активности клеточных оксидоредуктаз, включая митохондриальные дегидрогеназы [180]. Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают.

Для анализа клетки рассевали в 96-луночные плашки (BRAND plates, Германия) в концентрации 3×10^4 кл/яч. Планшеты инкубировали в CO_2-инкубаторе при 37°C, 5% CO_2 и 95% влажности. Через 24 ч предварительной инкубации из лунок удаляли ростовую среду и вносили по 200 мкл полной питательной среды, содержащей различные концентрации КС-144 от 13 мкг/мл до 5,0 мг/мл. Противоопухолевые препараты использовали в концентрациях, соответствующих выбранному экспериментальному диапазону.

При оценке комбинированного действия КС-144 с противоопухолевыми препаратами вещества вносили одновременно по схеме «шахматного» разведения, начиная от концентраций, близких к $ЦТК_{50}$, с последующими двукратными разведениями как КС-144, так и противоопухолевого препарата [181]. Объём каждого из компонентов составлял 50 мкл/яч. В ячейки отрицательного контроля вносили по 200 мкл питательной среды без добавления исследуемых веществ.

Планшеты с образцами инкубировали в течение 48 ч при 37°C, 5% CO_2 и 95% влажности. За 4 ч до окончания инкубации в каждую ячейку вносили по 20 мкл раствора МТТ и дополнительно инкубировали в CO_2-инкубаторе. После завершения инкубации планшеты центрифугировали при 300×g в течение 10 мин, надосадочную жидкость удаляли, а образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). После растворения формазана измеряли оптическую плотность на микропланшетном ридере Sunrise RC.4 (Tecan, Австрия) при длине волны 540 [182].

Цитотоксическую концентрацию, вызывающую снижение жизнеспособности клеточной культуры на 50% ($ЦТК_{50}$), рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.00 (Сан-Диего, США), на основании анализа зависимости «концентрация–эффект» с применением модели Хилла.

2.2.8 Исследование проапоптогенной активности

Проапоптогенную активность соединения КС-144 оценивали методом двойного окрашивания Annexin V-FITC/PI с последующим анализом клеток

методом проточной цитометрии. Метод основан на обнаружении транслокации фосфатидилсерина из внутреннего слоя плазматической мембраны во внешний, что является одним из ранних признаков апоптоза. Annexin V связывается с фосфатидилсерином с высокой аффинностью в присутствии ионов кальция, в то время как пропидиум иодид в основном проникает в клетки с нарушенной целостностью плазматической мембраны. Это позволяет различать живые, ранние апоптотические, поздние апоптотические и некротические клетки.

Для исследования опухолевые клетки высевали в 6-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 кл/яч и инкубировали 24 ч в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. Через 24 ч среду заменяли 4 мл свежей 10% ПКС, содержащей КС-144 в концентрации 0,063; 0,125; 0,25; 0,5 мг/мл и в качестве контрольного вещества использовали ПВП-иод. Длительность воздействия составляла 48 ч.

После инкубации клетки собирали, промывали холодным фосфатно-буферным раствором и ресуспендировали в 500 мкл буфера для связывания. Окрашивание проводили с использованием коммерческого набора реагентов Annexin V-FITC/PI (Invitrogen, Molecular Probes, США) в соответствии с инструкцией производителя. После добавления Annexin V-FITC и пропидиум иодида клетки инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение времени, рекомендованного производителем.

Анализ образцов проводили на проточном цитометре BD FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQuest Pro, используя возбуждения и эмиссии длинах волн 488 и 525 нм. При интерпретации результатов были выделены следующие популяции клеток: Annexin V^-/PI^- - живые клетки; Annexin V^+/PI^- - клетки на ранней стадии апоптоза; Annexin V^+/PI^+ - клетки на поздней стадии апоптоза или вторичного некроза; Annexin V^-/PI^+ - клетки с нарушенной целостностью мембраны.

2.2.9 Оценка апоптотической активности

Апоптотическую активность соединения КС-144 изучали в линиях клеток мезотелиомы (P31 и P31res1.2) с использованием метода двойного флуоресцентного окрашивания Hoechst 33342/PI (Invitrogen, США). Метод основан на оценке морфологических изменений ядерного материала и целостности плазматической мембраны клеток. Краситель Hoechst 33342 проникает в мембрану живых и апоптотических клеток и связывается с ДНК, что позволяет выявлять конденсацию и фрагментацию хроматина. Пропидий иодид в основном проникает в клетки с нарушенной целостностью мембраны, что позволяет дифференцировать клетки на поздней стадии апоптоза и некроза.

Клетки высевали в концентрации 5×10^3 кл/яч в объеме 300 мкл/яч в 48-луночный планшет инкубировали в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. Через 24 часа среду заменяли свежей полной средой, содержащей 0,125 - 0,5 мг/мл соединения КС-144 и 10% фетальной телячьей сыворотки. В качестве положительного контроля использовали цисплатин в концентрации 1,5 мкг/мл, что соответствует приблизительно 1,5 мкг/мл. Период воздействия

составлял 48 ч. После инкубации клетки окрашивали флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и пропидиум иодидом. В каждую ячейку добавляли 5 мкл раствора Hoechst 33342 и 10 мкл раствора пропидиум иодида в концентрации 25 мкг/мл. Окрашивание проводили в течение 15 минут при 4°C в темноте. После инкубации клетки промывали и анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TE300, оснащенного камерой Nikon DS (Nikon, США). В ходе микроскопического анализа оценивали морфологические признаки апоптоза, включая конденсацию хроматина, фрагментацию ядра и появление клеток с нарушенной целостностью мембраны.

2.2.10 Исследование колониеобразования опухолевых клеток

Способность опухолевых клеток к образованию колоний оценивали с помощью клоногенного анализа. Метод основан на определении способности отдельных жизнеспособных клеток сохранять репродуктивный потенциал и образовывать клеточные колонии после воздействия исследуемых веществ [183].

Исследование проводили на клеточной линии рака молочной железы (MCF-7), цисплатин-чувствительной линии мезотелиомы (P31) и цисплатин-устойчивой формы мезотелиомы (P31res1.2). Клетки в фазе экспоненциального роста собирали и высевали в 24-луночные планшеты с плотностью 5×10^3 кл/яч. Через 24 часа после посева клетки промывали фосфатно-буферным раствором, добавляли 1 мл свежей полной культуральной среды, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, КС-144 в концентрации 0,125 - 0,5 мг/мл, и цисплатин в концентрации 1,5 мкг/мл. Продолжительность воздействия исследуемых веществ на клетки составляла 24 ч. По окончании периода воздействия культуральную среду, содержащую исследуемые вещества, удаляли, клетки промывали фосфатно-буферным раствором, и добавляли новую полную среду без исследуемых соединений. Затем клетки инкубировали в среде, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 7 дней для образования колоний. После 7 - 10 дней инкубации среду удаляли, клетки промывали ФБС. Колонии фиксировали с помощью 500 мкл смеси метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1 в течение 20 мин и снова промывали ФБС. После окрашивания чашки Петри фотографировали с помощью камеры Nikon D90. Изображения анализировали в программе Fiji/ImageJ (National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд, США). Образование колоний оценивали по количеству образовавшихся колоний и/или интегрированной площади роста клеток и выражали в процентах относительно отрицательного контроля, который принимали за 100%.

2.2.11 Влияние КС-144 на клеточный цикл

Влияние КС-144 на дифференцировку фаз клеточного цикла изучалось на двух линиях клеток мезотелиомы с различной чувствительностью к цисплатину: P31 и P31res1.2. Данный метод основан на количественной оценке содержания ДНК в клетках после окрашивания пропидиум иодидом (PI), флуоресцентный

сигнал которого пропорционален количеству ДНК, что позволяет определить долю клеток в фазах G_0/G_1, S и G_2/M [184].

Клетки высевали в культуральные флаконы T25 (Corning, США) по $1,5\times10^6$ клеток на флакон в 5 мл полной культуральной среды, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки. Культивирование проводили в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2. После 24 ч инкубации клетки промывали фосфатно-буферным раствором и добавляли свежую полную культуральную среду, содержащую КС-144 в концентрациях 0,125, 0,25 и 0,5 мг/мл. В качестве положительного контроля использовали цисплатин в концентрации 1,5 мкг/мл. Длительность воздействия составляла 48 ч. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, культивируемые в полной среде без исследуемых веществ.

После инкубации клетки собирали путем трипсинизации, промывали холодным фосфатно-буферным раствором и фиксировали в 70% этаноле при 4°C. После фиксации клетки промывали фосфатно-солевым буфером и ресуспендировали в 500 мкл буфера для окрашивания. Для удаления РНК к клеточной суспензии добавляли 25 мкл РНКазы A (10 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) и для окрашивания вносили 25 мкл раствора PI (2,5 мг/мл, Calbiochem, Merck, Германия). Образцы инкубировали при 4°C в темноте в течение 20 минут. Интенсивность флуоресценции измеряли на проточном цитометре BD FACSCalibur (BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения CellQuest Pro. Распределение клеток по фазам G_0/G_1, S и G_2/M рассчитывали с помощью программного обеспечения ModFit LT (Verity Software House, США).

2.2.12 Исследование фрагментации ДНК методом TUNEL

Определение фрагментации ДНК проводили методом TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick-end Labelling) с использованием набора In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Cat. No. 11 684 795 910, Roche/Sigma-Aldrich, Германия), основаным на ферментативном включении меченых нуклеотидов в места разрывов ДНК и их последующем обнаружении с помощью флуоресцентной микроскопии [185]. TUNEL-позитивные клетки регистрировали по красному флуоресцентному сигналу fluorescein. Для дополнительного контрастного окрашивания всех ядер применяли Hoechst 33342 с синей флуоресценцией.

Для оценки апоптотического потенциала соединения КС-144 клетки мезотелиомы P31 высевали на 8-луночные микропланшеты (Ibidi, Германия) в количестве 2×10^4 кл/яч в 300 мкл полной культуральной среды и инкубировали в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. Через 24 часа клетки обрабатывали КС-144 в концентрациях от 0,125 до 0,5 мг/мл. В качестве положительного контроля использовали цисплатин в концентрации 1,5 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, не подвергавшиеся воздействию исследуемых веществ. Период воздействия составлял 48 ч. После инкубации клетки фиксировали раствором Histofix (Lactan, Gray, Австрия) в течение 10 минут. Затем клетки пермеабилизировали 0,1% раствором Triton ×100

в фосфатно-буферном растворе в течение 1 минуты. После пермеабилизации в каждую ячейку добавляли 50 мкл реакционной смеси TUNEL и инкубировали в течение 1 часа при 37°C в темноте в соответствии с инструкциями производителя. Для контрастного окрашивания ядер всех клеток использовали Hoechst 33342 (Molecular Probes Inc., США) в разведении 1:5000 в фосфатно-солевом буфере. Окрашивание проводили в течение 30 минут в темноте. После окрашивания изображения получали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TE300, оснащенного камерой Nikon DS.

2.2.13 Изучение мембранного потенциала митохондрий

Изменение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi m$) оценивали с использованием флуоресцентного катионного липофильного красителя родамина 123 (Rh123). Метод основан на способности Rh123 проникать через клеточные мембраны и накапливаться в митохондриях живых клеток в зависимости от электрохимического потенциала внутренней митохондриальной мембраны. Изменение накопления Rh123 и интенсивности его флуоресцентного сигнала отражает нарушение митохондриального мембранного потенциала и функционального состояния митохондрий [186].

В качестве тест-системы использовали клетки мезотелиомы P31res1.2. Клетки высевали в 6-луночные планшеты в количестве $2{,}5\times10^5$ кл/яч и инкубировали в полной культуральной среде в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. После предварительной инкубации клетки обрабатывали соединением КС-144 в концентрациях 0,25 и 0,5 мг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, культивируемые без добавления исследуемого соединения.

Для окрашивания готовили 5 мМ исходный раствор Rh123 в ДМСО. Рабочий раствор красителя получали путем разведения исходного раствора в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации 10 мкМ согласно рекомендациям производителя. После воздействия КС-144 клетки промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали с рабочим раствором Rh123 в темноте в течение 30 минут. После окрашивания клетки повторно промывали фосфатно-солевым буфером для удаления несвязанного красителя. Интенсивность флуоресценции Rh123 регистрировали методом флуоресцентной микроскопии. Изменение интенсивности флуоресценции Rh123 по сравнению с контрольной группой рассматривалось как индикатор изменений митохондриального мембранного потенциала. При интерпретации результатов учитывалось морфологическое состояние клеток, поскольку снижение или отсутствие накопления красителя, зависящего от потенциала, при выраженном цитотоксическом повреждении может быть связано с потерей жизнеспособности клеток и нарушением способности митохондрий удерживать Rh123.

2.2.14 Оценка уровня митохондриальных активных форм кислорода

Оценка уровня митохондриальных активных форм кислорода проводилась с использованием флуоресцентного зонда MitoSOX Red, (M36008, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, США), предназначенного для выявления изменений супероксид-ассоциированного окислительного сигнала в митохондриях живых клеток. После проникновения в клетки зонд преимущественно накапливается в митохондриях и при окислении митохондриальным супероксидом формирует флуоресцентный продукт, что позволяет регистрировать изменения уровня митохондриальных ROS методом флуоресцентной микроскопии.

В качестве тестовой системы использовались клетки мезотелиомы P31res1.2. Клетки высевали в количестве $2{,}5\times10^5$ кл/яч в 6-луночные планшеты и инкубировали в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. Клетки обрабатывали КС-144 в диапазоне концентраций 0,032 - 1,0 мг/мл. Время воздействия составляло 24 часа.

Для окрашивания был приготовлен рабочий раствор MitoSOX Red в среде RPMI-1640 в концентрации 5 мкМ. Клетки инкубировали с флуоресцентным красителем MitoSOX Red в течение 20 минут при 37°C в темноте. После окрашивания клетки промывали фосфатно-буферным раствором, и регистрировали флуоресцентный сигнал. Регистрацию средней интенсивности флуоресценции проводили на флуоресцентном микроскопе Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) при Ex/Em 510/580 нм в соответствии с протоколом производителя. Среднюю интенсивность флуоресценции рассчитывали по микрофотографиям и выражали в относительных единицах по отношению к отрицательному контролю.

2.2.15 Оценка образования активных форм кислорода и азота

Влияние КС-144 на образование активных форм кислорода и азота в клетках оценивали с использованием коммерческого набора Cellular ROS/RNS Assay Kit (ab139473, Abcam, США) в соответствии с протоколом производителя. Метод основан на применении клеточно-проникающих флуоресцентных зондов, позволяющих регистрировать образование ROS/RNS (образования активных форм кислорода и/или азота) в живых клетках под флуоресцентным микроскопом.

В качестве тестовой системы использовали опухолевую линию клеток мезотелиомы P31res1.2. Клетки высевали в количестве 2×10^5 кл/яч в 96-луночные планшеты (BRAND plates, Германия) и инкубировали в CO_2-инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 ч. Культивирование проводили в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки. Через 24 часа клетки обрабатывали исследуемыми концентрациями соединения КС-144. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, культивируемые в полной среде без исследуемого соединения. После периода воздействия в клетки добавляли флуоресцентные реагенты, входящие в комплект, согласно инструкции производителя. Анализ проводили на системе

высокопроизводительной биовизуализации (High-content Bioimaging system, BD Pathway, США) с использованием программного обеспечения AutoVision 4.0 (BD Pathway, США). Флуоресцентный сигнал регистрировали при Ex/Em = 490/525 нм для общего ROS-сигнала, Ex/Em = 550/620 нм для супероксид-ассоциированного сигнала и Ex/Em = 650/670 нм для NO-ассоциированного сигнала, что соответствует параметрам, указанным производителем набора.

2.2.16 Микроядерный тест на клетках млекопитающих *in vitro*

Микроядерный тест *in vitro* проводился в соответствии с Руководством ОЭСР по тестированию № 487 (2023) [187] с целью оценки генотоксического потенциала КС-144. Метод основан на выявлении микроядер в цитоплазме интерфазных клеток, которые могут образовываться вследствие хромосомных разрывов или нарушения расхождения хромосом в процессе клеточного деления. Этот тест позволяет выявлять вещества с кластогенным и анеугенным механизмами действия в клетках, которые делятся во время или после воздействия исследуемого соединения.

В качестве тест-системы использовали клетки мышиной лимфомы L5178Y TK+/- clone (3.7.2C). Обработку исследуемой субстанцией проводили в течение 4 ч (кратковременное воздействие) в присутствии и отсутствии системы метаболической активации S9. Использование S9-смеси позволило оценить возможное проявление генотоксического действия соединения после метаболической активации. В качестве растворителя использовали среду для обработки клеток. В качестве положительного контроля без метаболической активации применяли митомицин С (Sigma-Aldrich Co., США) для мутагенов прямого действия без метаболической активации, а в качестве промутагенного агента циклофосфамид (Sigma-Aldrich Co., США) с условиями метаболической активации. Каждое экспериментальное условие выполняли в трёх параллельных культурах.

Цитотоксичность исследуемого вещества оценивали по индексу относительного роста количества клеток (Relative Increase in Cell Count, RICC), согласно методике, описанной в руководстве ОЭСР № 487. Этот индекс позволяет оценить влияние исследуемого вещества на пролиферативную активность клеток и выбрать концентрации для микроядерного анализа. Для предварительной оценки цитотоксичности КС-144 изучали в диапазоне концентраций от 0,016 до 5 мг/мл. На основании полученных данных для микроядерного анализа были выбраны концентрации от 0,016 до 0,25 мг/мл, поскольку они не вызывали выраженного цитотоксического эффекта по показателю RICC и не препятствовали правильной интерпретации генотоксического эффекта.

RICC рассчитывался по следующей формуле:

$$RICC=(It2-It1)/(Ic2-Ic1)\times100, \quad (17)$$

где, It2 – увеличение количества клеток в обработанной культуре (конечная концентрация клеток);

Ic2 – увеличение количества клеток в отрицательной контрольной культуре (конечная концентрация клеток);

It1 – начальная концентрация клеток в обработанной культуре;

Ic1 – начальная концентрация клеток в культуре отрицательного контроля

На основе RICC процент токсичности (% Tox) рассчитывался по следующей формуле:

$$\% \text{ Tox} = 100\% - \text{RICC} \quad (18)$$

Уровень цитотоксичности поддерживали в допустимом диапазоне (обычно < 50%) для обеспечения достоверной оценки генотоксичности. На следующем этапе, для микроядерного теста, собранные клетки набухали путем добавления гипотонической среды (RPMI-1640, стерильная дистиллированная вода, полоксамер 188) в течение 10 мин при 37°C, а затем промывали холодным фиксатором (этанол к уксусной кислоте, 3:1). Несколько капель суспензии клеточного осадка наносили на предварительно очищенные стеклянные предметные стекла микроскопа и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Затем препараты окрашивали 3%-ным буферным раствором Гимзы (Thermo Fisher Scientific, США) и исследовали под люминесцентным микроскопом DM2500 (Leica Microsystem, Германия). Всего около 1000 клеток в каждой повторной пробе оценивали на наличие микроядер (МН) на основе трех критериев: (1) их размер не превышал одной трети размера основного ядра, (2) они не имели физической связи с основным ядром и (3) имели ту же окраску и интенсивность, что и основное ядро [188]. Частоту микроядер рассчитывали как отношение числа клеток, содержащих микроядра, к общему числу проанализированных клеток и выражали в процентах.

2.2.17 Вестерн-блоттинг

Клетки мезотелиомы P31res1.2 культивировали в чашках Петри при количестве клеток $3{,}5\times10^6$ в 5 мл полной культуральной среды. После 24 ч инкубации клетки подвергали воздействию 0,063 - 0,25 мг/мл КС-144 и/или 1,5 мкг/мл цисплатина. Длительность воздействия составляла 48 ч.

Образцы собирались после 48 ч после воздействия в 1 - 2 мл буфере RIPA (1% Triton×100, 0,5% SDS, 0,5% Na-deoxycholate, 150 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 7,6). Перед использованием в буфер добавляли ингибиторы протеаз PMSF, леупептин и апротинин. Клеточные лизаты выдерживали на льду в течение 30 минут, а затем подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 секунд. Затем образцы центрифугировали при 16 000×g в течение 20 минут при 4°C. Супернатанты, содержащие суммарные клеточные белки, использовали для последующего анализа.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда, в качестве

стандарта использовали буфер RIPA. Измеряли спектрофотометром PD-303UV (Apel, Япония) при длине волны 600 нм.

Экспрессию белков цитохрома c, p21, циклина D1 и CDK4 оценивали путем электрофоретического разделения белков по молекулярной массе на денатурирующем SDS-PAGE геле с последующим вестерн-блоттингом [189].

Образцы белка готовили путем кипячения в 1× буфере для образцов при 100°C в течение 5 мин. 2× буфер для образцов содержал 125 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 10% β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0,02% бромфенолового синего и 20% глицерина. На гель наносили 12 мкг общего белка из каждого образца. Электрофорез белков проводили на системе PROTEAN II Ready Gel System (Bio-Rad, США), в соответствии с инструкциями производителя. Концентрирование белка проводили на концентрирующем геле при 90 V в течение 20 мин, после чего проводили разделение белков на 10% полиакриламидном геле при 100 V в течение 40 мин. В качестве буфера для электрода использовали стандартный трис-глициновый буфер, pH 8,3, содержащий 25 мМ трис, 192 мМ глицина и 0,1% SDS. После электрофореза белки переносили на поливинилиденфторидные мембраны (PVDF) Pierce, Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell System. После переноса мембраны инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в блокирующем растворе, содержащем 5% обезжиренного сухого молока и 0,1% Tween-20 в 1× TBS (трис-буферный солевой раствор: 50 мМ Трис-HCl, pH 7.6, и 20 мМ NaCl). После блокирования мембрану инкубировали с первичными аффинно-очищенными антителами против цитохрома c, p21, циклина D1 и CDK4 в разведении 1:1000 в блокирующем буфере, содержащем 0,1% Tween-20, в течение ночи при 4°C. На следующий день мембрану промывали пять раз промывочным буфером, содержащим 1×TBS и 0,1% Tween-20, по 10 мин каждый раз.

Затем мембрану инкубировали со вторичными антителами в разведении 1:5000 в блокирующем буфере, содержащем 0,1% Tween-20, в течение 1 часа при комнатной температуре. После инкубации мембрану снова промывали пять раз промывочным буфером по 10 мин каждый раз. Для визуализации белковых полос использовали хемилюминесцентный субстрат (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad). Рабочий раствор субстрата готовили путем смешивания равных объемов раствора перекиси водорода и раствора люминола и наносили на мембрану со скоростью 0,1 мл/см². Мембрану инкубировали с субстратом в темноте в течение 5 минут, затем экспонировали на рентгеновскую пленку «Kodak X-Omat».

2.2.18 Субкультивирование микробиологических тест-штаммов

Пересев музейных тест-штаммов проводили на скошенном питательном агаре. Для получения рабочих культур микроорганизмы реинокулировали в пробирки со свежеприготовленными агаровыми скошенными средами каждые 14 дней. Антибиотикорезистентность штаммов поддерживали путем пересева в соево-казеиновый бульон с добавлением соответствующих антибиотиков. Тип и концентрация антибиотика подбирались в соответствии с паспортными

характеристиками каждого микроорганизма. Фенотипические свойства культур поддерживали в соответствии с требованиями, указанными в паспортных данных штаммов. При необходимости культуры пересевали на питательные среды, содержащие 5% крови.

2.2.19 Реактивация микроорганизмов

Реактивацию микроорганизмов и оценку их жизнеспособности проводили путем серийного десятикратного разведения с последующим посевом на плотные питательные среды. Для приготовления серии разведений в десять стерильных пробирок предварительно вносили по 9 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. В криопробирку, содержащую замороженную культуру добавляли 1 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида, после чего помещали в термостат при 37°С на 3 - 5 минут.

После восстановления культуры содержимое криопробирки или флакона тщательно перемешивали и полностью переносили в первую пробирку, содержащую 9 мл изотонического раствора хлорида натрия. Полученную микробную суспензию принимали за 10^{-1} разведение. Для приготовления следующего разведения 1 мл суспензии отбирали из первой пробирки и добавляли во вторую пробирку, содержащую 9 мл растворителя, в результате чего получали разведение 10^{-2}. Следуя этой схеме, готовили серийные десятикратные разведения до 10^{-10}, используя на каждом этапе новую стерильную пипетку или наконечник.

На чашках Петри с питательным агаром проводили три параллельных посева из разведений 10^{-5}, 10^{-7} и 10^{-10}. Объем добавляемой микробной суспензии составлял 0,1 мл. После равномерного распределения инокулята по поверхности культуральной среды чашки инкубировали при 37°С в течение 18 - 24 ч. После завершения инкубации подсчитывали количество колоний, образовавшихся на трех параллельных посевах из одного и того же разведения. Среднее количество колоний определяли по следующей формуле:

$$A = \frac{(a_1 + a_2 + a_3)}{3} \tag{19}$$

где, A – среднее количество колоний, выросших из выбранного разведения;
a_1 –количество выросших колоний на первой чашке Петри;
a_2 –количество выросших колоний на второй чашке Петри;
a_3 –количество выросших колоний на третьей чашке Петри.

Концентрацию жизнеспособных микроорганизмов в исходной суспензии, выраженную в колониеобразующих единицах на миллилитр, рассчитывали по следующей формуле:

$$M = \frac{A \times 10^n}{V} \tag{20}$$

где, M – количество жизнеспособных клеток в 1 мл, КОЕ/мл;

A – среднее число выросших колоний из высеваемого разведения;

V – объем суспензии, взятый для посева, в мл;

10^n – коэффициент разведения.

2.2.20 Хранение тест-штаммов в условиях криоконсервации

Для длительного хранения музейных культур микроорганизмов при условии сохранения генотипических и фенотипических характеристик использовали метод криоконсервации бактерии. В качестве криопротекторов брали поливинилпиролидон (Mr = 40000) сахарозу и глицерол, основой служил питательный бульон. Криоконсервации подлежали суточные культуры, выращенные при оптимальных условиях. Культуру снимали бактериологической петлей с поверхности агаризовонных сред и суспендировали в 1 мл защитной среды, разлитой в криопробирки. Криопробирки с материалом помещали в биомедицинский морозильник MDF-U537D (Sanyo) при температуре -20°C на 1 ч, затем закладывали на длительное хранение в низкотемпературный холодильник MDF-U73V (Sanyo) при -80°C.

2.2.21 Морфо-культуральные и физиолого-биохимические свойства

Изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических характеристик музейных микробных штаммов проводили с использованием стандартных микробиологических методов. Комплекс исследований включал оценку культуральных признаков, микроскопическое изучение клеток, определение подвижности, ферментативной активности и биохимического профиля микроорганизмов.

Морфологические особенности клеток оценивали после окрашивания по Граму с последующим микроскопированием на фазово-контрастном микроскопе Leica DM 2500 (Leica Microsystem, Германия). Морфологию колоний изучали, учитывая их формы, размера, цвета, консистенции, плотности, профиля, особенности края и поверхности. Наблюдения проводили с использованием стереомикроскопа Leica MZ 9.5 (Leica Microsystems, Германия).

Подвижность микроорганизмов определяли по характеристикам роста после инокуляции на полужидкий агар. Каталазную активность оценивали с с раствором перекиси водорода, а активность оксидазы с использованием коммерческих оксидазных дисков DD018. Активность ДНКазы определяли по характеру роста на дифференциально-диагностической среде агаре М1041 для тестирования ДНКазы с толуидиновым синим. Гемолитическую активность оценивали на кровяном агаре, приготовленном на основе М073 с добавлением 5% дефибринированной крови.

Другие биохимические признаки исследовали с использованием коммерческих диагностических наборов Erba Lachema (Чехия), в соответствии с инструкциями производителя.

2.2.22 Оценка мутагенной активности в бактериальной тест-системе

Бактериальную мутагенную активность соединения КС-144 оценивали методом обратной мутации, т.е. тестом Эймса, в соответствии с Руководством ОЭСР № 471 «Тест на обратную бактериальную мутацию» (2020) [171] с использованием протокола Марона и Эймса с небольшими изменениями [190]. Метод основывался на определении способности исследуемого вещества индуцировать обратные мутации в ауксотрофных тест-штаммах *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli*. Эти мутации восстанавливали способность клеток синтезировать соответствующую аминокислоту и приводили к образованию ревертантных колоний в минимальной среде.

Для определения прямого мутагенного эффекта исследуемого вещества и возможных эффектов, возникающих после его биотрансформации, эксперимент проводился в двух условиях: без использования системы метаболической активации и с включением микросомальной системы S9. Для приготовления растворов КС-144 использовался фосфатно-солевой буфер, который одновременно служил отрицательным контролем. В качестве положительных контролей использовались стандартные соединения с известной мутагенной активностью. В вариантах без системы S9 использовались мутагены прямого действия, включая азид натрия, метилметансульфонат и 2,4,7-тринитро-9-флуоренон. В случае метаболической активации использовались промутагены 2-аминоантрацена и бензо[а]пирена, проявляющие мутагенные свойства после метаболизма. Все стандартные контрольные вещества (Sigma-Aldrich, США).

Тест проводили методом посева на агаровые чашки. Для штаммов *S. typhimurium* добавляли небольшие количества гистидина и биотина, а для штаммов *E. coli* триптофан. Это обеспечивало ограниченное деление клеток и позволяло выявлять ревертантные колонии. Культуры исследуемых штаммов выращивали в питательном бульоне для *S. typhimurium* и в бульоне Лурия-Бертани для *E. coli* (Himedia, Индия). Культуральные среды готовили в дистиллированной воде и стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 20 минут.

В ходе эксперимента к расплавленному верхнему агару добавляли 0,1 мл соответствующей бактериальной культуры тестового штамма и 0,1 мл раствора КС-144 в заданной концентрации. Для метаболически активированных вариантов дополнительно добавляли 0,5 мл S9-микса. После смешивания компонентов смесь равномерно распределяли по поверхности чашек Петри с минимальной агаровой средой. Соединение КС-144 тестировали в дозах 0,05; 0,158; 0,5; 1,581 и 5 мг на чашку. После полного застывания верхнего слоя агара чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 48±12 ч.

В исследование включали следующие контрольные варианты: отрицательный контроль без метаболической активации, содержащий бактериальную культуру и растворитель; отрицательный контроль с метаболической активацией содержит бактериальную культуру, растворитель и S9-mix; положительный контроль без метаболической активации, содержащий бактериальную культуру и соответствующий мутаген прямого действия;

положительный контроль с метаболической активацией, бактериальная культура, промутаген и S9-mix.

Результаты регистрировали путем подсчета количества ревертантных колоний на каждой чашке после окончания инкубации. Мутагенный эффект оценивали с учетом увеличения числа ревертантных колоний в экспериментальных вариантах по сравнению с отрицательным контролем, дозозависимости эффекта и воспроизводимости результатов. Положительные контроли использовали для подтверждения чувствительности тестовых штаммов и функциональности системы метаболической активации. Каждую концентрацию тестируемого вещества, а также отрицательные и положительные контроли тестировали в трех повторениях.

2.2.23 Исследования на лабораторных животных

В исследованиях использовали аутбредных крыс Wistar возрастом 6-8 недель, содержавшихся в условиях SPF-вивария. Доклинические исследования проводили с учетом требований законодательства Республики Казахстан в сфере охраны здоровья и обращения лекарственных средств, установленных Кодексом Республики Казахстан от 7 июля 2020 года № 360-VI ЗРК «О здоровье народа и системе здравоохранения», требований надлежащей лабораторной практики, утвержденных приказом и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15, и Правил реализации принципов надлежащей лабораторной практики, утвержденных приказом Министра торговли и интеграции Республики Казахстан от 17 июня 2021 года № 414-НҚ. Все процедуры с лабораторными животными проводились в соответствии с принципами Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента [191] и Совета Европейского союза о защите животных, используемых в научных целях, Закона РК от 4 марта 2022 года № 45-р «Об ответственном обращении с животными» и Протоколами исследования, одобренные Комиссией по биоэтике АО «НЦПП» (протоколы № 14/1 и 14/2 от 01.04.2019), (см. Приложение Ж и Приложение И).

Исследования проводили в «чистых» помещениях АО «НЦПП» по содержанию лабораторных животных. Карантинный и адаптационный период составлял 4 недели. Лабораторных животных содержали в стандартизированных условиях окружающей среды, в индивидуально вентилируемых клетках, при 12-часовом световом режиме день/ночь (12:12), температуре 22°С и относительной влажности 50±10%. Животных кормили полнорационным сбалансированным гранулированным автоклавируемым кормом для лабораторных грызунов промышленного производства SSNIFF, Германия. Корм и воду предоставляли в неограниченном количестве.

Животных содержали в клетках с подстилочным материалом Renofix MK 2000. Животных распределяли по экспериментальным группам после маркировки и простой рандомизации. Маркировку проводили путем нанесения меток маркером на шерсть конечностей, спины и головы.

Эфтаназию животных проводили в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными после достижения глубокой анестезии

путем введения Золетила 100 в дозе 20 мг/кг. Метод эвтаназии выбирали в соответствии с утвержденным протоколом исследования. После эфтаназии животных из эксперимента проводили вскрытие и извлекали необходимый биологический материал.

2.2.24 Изучение острой токсичности КС-144 на крысах

Изучение острой токсичности КС-144 при пероральном введении проводили методом острого токсического класса на белых аутбредных крысах Wistar самках массой 180,0 г ± 10% в соответствии ГОСТ 32644-2014 и с Руководством OECD 423 (2001) [192] и в рамках исследований, ранее отраженных в промежуточном отчете о НИР по научно-технической программе «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018–2020 гг.» за 2019 год [193]. Выбор данного метода был обусловлен необходимостью оценки острой пероральной токсичности исследуемого вещества с учётом биоэтических принципов 3R, направленных на сокращение количества используемых лабораторных животных [104, 150, 190]. Субстанцию КС-144 растворяли в стерильной воде для инъекций, затем фиксировали животное, после чего раствор медленно вводили внутрижелудочно с использованием зонда. Объем вводимого раствора составил не более 2 мл на 100 г веса животного. Пероральный путь введения был выбран как предполагаемый путь клинического применения исследуемой субстанции. С учётом литературных данных о токсичности отдельных иодсодержащих соединений, а также в соответствии с подходом OECD 423, стартовая доза КС-144 составляла 2000 мг/кг [104, 150, 190, 193]. Поэтому стартовая доза была 2000 мг/кг. При отсутствии гибели животных и выраженных клинических признаков токсичности исследуемую субстанцию вводили в удвоенной дозе трем другим крысам. Результаты оценивали по показателям смертности и выраженности клинических признаков токсичности. Наблюдение за экспериментальными животными осуществляли в течение 15 суток, после чего проводили эвтанацию цервикальной дислокацией и вскрытие для патоморфологического описания внутренних органов. При обнаружении внешних патологических изменений проводили гистологию. Для этого фиксировали весь орган или ткань в 10% растворе нейтрального формалина. По полученным результатам проводили оценку токсичности в соответствии с классификацией опасности и маркировки химических веществ (СГС) [194, 195].

2.2.25 Предварительная оценка эффективности КС-144 *in vivo*

Предварительное исследование комбинированной противоопухолевой активности координационного соединения иода КС-144 выполнено на экспериментальной модели перевиваемой опухоли яичников крыс АфОЯ [196]. В исследовании использовали 70 аутобредных самок крыс Wistar, возрастом 1,5 - 2,5 месяца и весом 180 - 200 грамм. Для моделирования метастатического поражения лёгких при внутривенной перевивке опухоли АфОЯ использовали асцитную жидкость, содержащую опухолевые клетки карциномы яичников крыс АфОЯ. Выбор внутривенного введения опухолевых клеток АфОЯ был

обусловлен спецификой данной экспериментальной модели. Несмотря на близость опухолевого штамма к тканям яичников и брюшины, внутривенное введение в основном приводит к задержке и развитию опухолевых клеток в легочной ткани, что приводит к образованию множественных метастатических очагов. Таким образом, внутривенное введение клеток АфОЯ позволяет создать модель метастазирования в легкие, подходящую для оценки противоопухолевой эффективности изучаемых соединений. В данном исследовании в качестве основного критерия эффективности было выбрано увеличение времени выживания животных, поскольку развитие метастазов в легкие определяет тяжесть опухолевого процесса и последующее ухудшение общего состояния животных. Опухолевый материал был предоставлен В.К. Красноштановым, ТОО «НИИ онкологии и радиологии». Процедуру перевивки опухоли и моделирование рака на животных проводили согласно методу, описанному в руководстве [197], с модификацией. Асцитную жидкость с опухолевыми клетками вводили животным в хвостовую вену в объёме 0,2 мл, содержащем 5×10^6 клеток. День перевивки опухоли считали нулевым днём эксперимента [193].

Субстанцию КС-144 вводили перорально. Данный способ введения выбран на основании того, что КС-144 планируется использовать в клинике перорально. Выбор дозы основывался на результатах предварительного исследования острой токсичности. В качестве отправной точки была максимально-переносимая доза (МПД) 4000 мг/кг, коэффициент снижения доз в 10 раз.

Доксорубицин вводили внутрибрюшинно, растворы приготавливали на стерильном изотоническом растворе хлорида натрия. Терапевтическая доза доксорубицина была рассчитана путём межвидового пересчёта дозы по площади поверхности тела с использованием коэффициента пересчёта для крыс и составила 8,3 мг/кг [198].

Эффективность терапии оценивали по увеличению средней продолжительности жизни (УПЖ). В таблице 2 представлен дизайн эксперимента. Каждая группа включала по 10 особей. Терапию начинали через 2 дня после перевивки АфОЯ и продолжали 10 дней.

Таблица 2 – Дизайн эксперимента по изучению противоопухолевой активности КС-144 на АфОЯ [193]

Группы животных	**Терапия**
1	Контрольная группа (без опухоли)
2	Контрольная группа (с опухолью, без терапии)
3	Доксорубицин 8,3 мг/кг
4	КС-144 400,0 мг/кг
5	КС-144 4,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг
6	КС-144 40,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг
7	КС-144 400,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг

КС-144 вводили перорально ежедневно в течение 10 дней. В монотерапии КС-144 применяли в дозе 400,0 мг/кг, соответствующей 1/10 от максимальной испытанной дозы. В комбинированной терапии КС-144 применяли в дозах 4,0; 40,0 и 400,0 мг/кг, что соответствовало 1/1000, 1/100 и 1/10 от максимальной испытанной дозы, соответственно. Лекарственное средство доксорубицин вводили внутрибрюшинно в дозе 8,3 мг/кг через день в течение 10 дней. Лечение животных доксорубицином и КС-144 в монорежиме и комбинированно проводили в течение 10 дней, начиная со 2-го дня после после инокуляции опухоли [193].

Выживаемость в экспериментальных группах анализировалась методами Каплана–Мейера и Першина. Статистическая значимость различий между кривыми выживаемости оценивалась с помощью лог-рангового теста.

Увеличение выживаемости рассчитывалось по следующей формуле:

$$\text{УПЖ в \%} = \frac{\text{СПЖо} - \text{СПЖк}}{\text{СПЖк}} \times 100 \quad (21)$$

где, СПЖо – средняя продолжительность жизни животных опытной группы;

СПЖк – средняя продолжительность жизни животных контрольной группы с опухолью без терапии.

Эффект в отношении продолжительности жизни считался значимым при УПЖ ≥ 25%. В ходе исследования также проводилась оценка общеклинического состояние животных [195].

2.2.26 Статистические методы

Исследования *in vitro* проводили не менее чем в трех независимых повторностях. Для анализа полученных данных применяли методы описательной статистики. Для количественных показателей рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартное отклонение (M ± SD).

Статистический анализ проводили при помощи программы GraphPad Prism версии 6.00 для Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Цитотоксическую концентрацию, приводящую к 50% гибели клеток ($ЦТК_{50}$), рассчитывали по кривым «доза-эффект» с использованием нелинейной регрессии и модели Хилла [199].

Гипотезу о равенстве средних значений проверяли параметрическими и непараметрическими критериями после оценки нормальности распределения случайной величины тестом Шапиро-Уилка [199]. При нормальном распределении данных для сравнения двух независимых групп применяли t-критерий Стьюдента. При сравнении трёх и более групп с нормальным распределением использовали дисперсионный анализ. Для параметров с ненормальным распределением нуль-гипотезу проверяли непараметрическим критерием Краскела-Уэллиса или Манну-Уинтни. Множественное сравнение проводили в тесте Даннета.

Для анализа выживаемости животных строили кривые Каплана-Мейера, статистическую значимость различий между кривыми выживаемости оценивали с использованием лог-рангового критерия [193].

Значения уровня достоверности $p > 0,05$ считали несущественными.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 *In silico* моделирование и синтез КС-144

Перед разработкой нового координационного соединения иода был проведен анализ литературных данных о соединениях иода, близких по химической природе и принципам комплексообразования. При разработке КС-144 были использованы методические подходы к моделированию и получению координационных соединений, применяемые в АО «НЦПП». На предварительном этапе были проведены *in silico* исследования, направленные на моделирование возможных локальных координационных взаимодействий между компонентами иодсодержащей системы [156, 172, 200]. Квантово-химическое моделирование использовали для оценки возможных взаимодействий иодсодержащих частиц, ионов лития и функциональных групп органической матрицы. В расчетных моделях рассматривали несколько вариантов взаимного расположения и взаимодействия компонентов. Полученные результаты показали энергетическую возможность формирования модельных конфигураций, предусматривающих ассоциацию иодсодержащих частиц с органической матрицей и участие ионов Li^+ во взаимодействиях с кислородсодержащими функциональными группами. В рамках предложенной модели полииодидные фрагменты могут быть локализованы во внутренней области спиральной структуры декстрина. Наличие полииодидных форм также может обусловливать характерную интенсивную окраску иодсодержащей системы от темно-синего до темно-фиолетового цвета. Возможное участие аминных, карбоксильных и других кислород- и азотсодержащих функциональных групп пептидного компонента в стабилизации иодсодержащих фрагментов было рассмотрено на уровне модельных взаимодействий.

На основании результатов *in silico* моделирования и предварительной оценки возможных координационных взаимодействий для дальнейшего синтеза был выбран состав координационного соединения иода под шифром КС-144. Расчётное соотношение компонентов, использованных при синтезе КС-144, представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Исходные компоненты и концентрации приготовленных растворов, использованных при получении КС-144

Тип компонента	**Наименование**	**Концентрация приготовленного раствора, г/л**
Основные компоненты	Молекулярный иод Калий иодид Литий хлорид	8,0 10,0 4,0
Комплексообразователи	α-Декстрин Полипептиды (гидролизат альбумина)	130 33

Комплексные физико-химические, спектроскопические исследования подтверждают успешный синтез и стабильность новой комплексной системы. Теоретическое моделирование с использованием расчетов теории функционала плотности (DFT) продемонстрировало отрицательное значение расчетной энергии образования (ΔE = -843,27 ккал/моль), что свидетельствует об энергетической выгодности предложенной модельной конфигурации. Оптимизированная геометрия модельной структуры характеризовалась расчетными расстояниями Li-O = 2,22 Å и Li-I = 3,02 Å, что согласуется с возможным участием ионов Li^+ в локальных координационных взаимодействиях.

С учетом результатов *in silico* моделирования и выбора компонентного состава был проведен синтез иодсодержащего вещества КС-144. В ходе работы были получены три экспериментальные серии координационных соединений иода: КС-144 (серия 01090119), КС-144 (серия 02230519), КС-144 (серия 03230819).

Таким образом, для отражения последовательности получения субстанции КС-144 была разработана технологическая схема, включающая основные этапы процесса: подготовку растворителей и реакционной ёмкости, подготовку исходных компонентов, синтез координационного соединения иода, очистку реакционной смеси, высушивание, измельчение, фасовку и контроль готовой продукции. На каждой стадии были определены основные технологические параметры и контрольные точки, обеспечивающие воспроизводимость процесса и получение субстанции с заданными физико-химическими характеристиками.

Технологическая карта получения координационного соединения иода представлена на рисунке 8.



Рисунок 8 – Блок-схема технологического процесса получения субстанции КС-144

3.2 Физико-химические свойства КС-144

Полученные серии КС-144 представляют собой формулированное иодсодержащее соединение, относящееся к комплексам с переносом заряда по типу донор-акцептор, характерным для галогенов (особенно иода) или ионных комплексов с полидентатными лигандами [200, 201]. Лигандное окружение соединения представлено полисахаридно-пептидной матрицей, включающей декстринсодержащие (1→4)-связанные глюкопиранозные фрагменты и полипептидные компоненты, участвующие в стабилизации иодсодержащих форм, и называемые «дилитий (I) (1 → 4) - L-D-полиглюкан трииодид хлорид».

КС-144 представляет собой многокомпонентное иодсодержащее соединение на основе полисахаридно-пептидной матрицы. Для КС-144 приведена брутто-формула $6C_{294}H_{492}O_{238}\cdot LiI_3\cdot LiCl\cdot C_{53}H_{95}N_{13}O_{14}$, отражающая предложенное структурно-расчетное представление декстринового, пептидного и литий-иодсодержащего компонентов. КС-144 был получен по методу, защищенному патентом США US10251939B2 / U.S. Patent No. 10,251,939 B2 от 09.04.2019. Предлагаемая модель взаимодействия компонентов КС-144 представлена на рисунке 9.

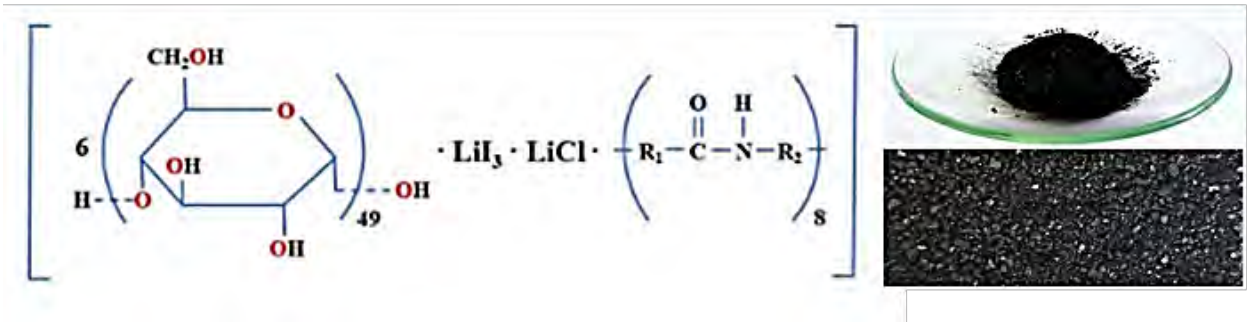


Рисунок 9 – Предполагаемая химическая структура синтезированного соединения КС-144

Все синтезированные серии КС-144 характеризовались однородной порошкообразной структурой, от темно-синего до коричнево-фиолетового окраса и слабым запахом иода. Такая окраска соответствовала присутствию иодсодержащих форм в составе комплекса. Отсутствие видимых механических включений и визуальная однородность порошкообразной массы характеризовали однородность полученного продукта по внешнему виду.

Для оценки воспроизводимости полученных серий была проведена оценка основных показателей качества, характеризующих физико-химическую стабильность вещества и его пригодность для аналитических исследований. Особое внимание было уделено параметрам, характеризующим состояние иодсодержащих форм, свойствам вещества в водной среде и технологическим характеристикам полученного порошка. Такой подход позволил рассматривать КС-144 не только как синтезированное соединение, но и как вещество, пригодное для дальнейших фармацевтических и биологических исследований.

Основные физико-химические свойства синтезированного вещества КС-144, включая описание, эмпирическую формулу, значение pH, растворимость, температуру плавления, содержание иода и иодида, кинематическую вязкость, относительную плотность, конечную массу и выход продукта, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Основные физико-химические свойства КС-144

Индикаторы	**Результаты**
Описание	Коричнево-фиолетовый порошок со слабым запахом иода
Брутто-формула	$6C_{294}H_{492}O_{238}\cdot LiI_3\cdot LiCl\cdot C_{53}H_{95}N_{13}O_{14}$
pH раствора	около 3,75 - 3,85
Растворимость в воде	1 г/20 мл
Температура плавления (°C)	215 - 225
Количественное определение иода, г/кг	7,13
Количественное определение иодида, г/кг	10,72
Кинематическая вязкость, $мм^2/с$	1,330
Плотность, $г/см^3$	1,0504
Конечная масса, г	9,50
Выход, %	95

Растворимость комплексов в воде оценивали с использованием колбового метода (для концентраций выше 0.01 г/л) в соответствии с Руководством ОЭСР определению растворимости химических веществ в воде. Результаты исследования показали, что растворимость КС-144 в воде составляет 1 г/20 мл, что позволяет готовить водные растворы вещества для последующих аналитических и биологических исследований.

Содержание иодсодержащих компонентов в КС-144 определяли методом капиллярного электрофореза. Среднее содержание иода составило 7,13 г/кг, а содержание иодида 10,72 г/кг. Полученные значения использовали в качестве количественных характеристик иодсодержащего компонента КС-144.

3.2.1 УФ-видимая спектроскопия КС-144

Комплексообразование и состояние иодсодержащих форм в составе КС-144 исследовалось методом УФ-видимойспектроскопии в диапазоне длин волн от 190 до 900 нм (рисунок 10).

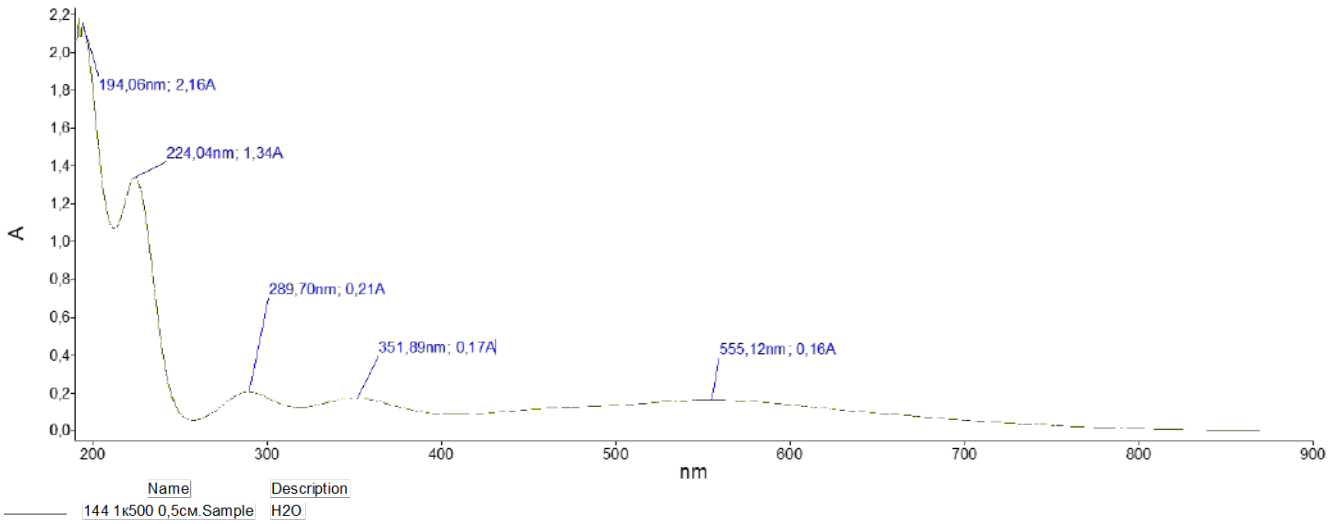


Рисунок 10 – УФ-видимый спектр водного раствора КС-144

Также УФ спектры субстанции КС-144 по каждой серии представлены в Приложение М.

Для интерпретации спектральных характеристик КС-144 было проведено сопоставление полученных полос поглощения с литературными данными для различных иодсодержащих форм. Обобщенное отнесение характерных полос поглощения представлено в таблице 5.

Таблица 5 – Отнесение полос поглощения в УФ-видимых спектрах иодсодержащих форм

Форма иода в растворе	**λ, нм**					
	190-195	220-228	278-291	345-355	450-520	540-610
	Формы					
	I^-	I^-	I_3^-	$IO^-(I^+)$	$I_2 \cdot nH_2O$	I_5^-
KI	194	224	-	-	-	-
I_2	-	-	-	352 о.сл.	450 ос.л.	-
KI_3	194	224	290	352 о.сл.	450 ос.л.	-
Полииодид	+	+	290	352	450 ос.л.	555
КС-144	194	224	290	352	450 ос.л.	555
Примечание - о.сл. – очень слабо						

Результаты УФ-видимой спектроскопии показали наличие в спектре КС-144 нескольких характерных полос поглощения в областях 194, 224, 290, 352 и 555 - 565 нм. Полосы в коротковолновой области 190 - 228 нм могут быть связаны с поглощением иодид-иона, а также с электронными переходами функциональных групп органической полисахаридно-пептидной матрицы. Полосы в области около 290 и 352 нм соответствуют спектральным признакам трииодидных форм I_3^-. Наличие длинноволновой полосы в области 555 - 565 нм указывает на присутствие полииодидных ассоциатов и/или комплексов с переносом заряда.

Сопоставление спектра КС-144 со спектрами модельных иодсодержащих систем свидетельствует о том, что в составе исследуемого соединения присутствуют иодидные, трииодидные и полииодидные формы. При этом органическая полисахаридно-пептидная матрица может участвовать в стабилизации иодсодержащих фрагментов за счет водородных связей и донорно-акцепторных взаимодействий. Полученные спектральные данные позволяют предположить образования двух иодсодержащих комплексов с переносом заряда: $NH_2 \rightarrow I^+\text{-}I^-$; $C{=}O \rightarrow I^+\text{-}I^-$. В спектрах комплекса декстрин–KI–I_2–аминокислота имеется серия полос, положение и отнесение которых приводится ниже в таблице 6.

Таблица 6 – Описание спектральных характеристик субстанции КС-144

Соединение	**λ_{max}, нм**	**A_{max}**	**Отнесение**	
КС-144	194,06	2,16	n → σ* C-O-C и C-OH; I^-; $-NH_3^+$ [172]	Поглощение в дальнем УФ, связанное с органической матрицей и иодидными формами
	224,04	1,34	$n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ C=O…I–I [172] $I^- \rightarrow \sigma^*$ H_2O, C-OH	Полоса, связанная с иодид-ионом и электронными переходами органических функциональных групп
	289,70	0,21	$I_3^- \rightarrow \sigma^*$ H_2O, C-OH [202]	Полоса, характерная для трииодид-иона I_3^-
	351,89	0,17	$I_3^- \rightarrow \sigma^*$ H_2O [202]	Полоса, характерная для трииодидных/полииодидных форм
	565,12	0,16	Переход I_2 $\pi^* \rightarrow \sigma^*$.	Длинноволновая полоса, связанная с полииодидными ассоциатами и комплексами с переносом заряда

В УФ-видимом спектре КС-144 наряду с полосами в коротковолновой области 194,06 и 224,04 нм зарегистрированы максимумы поглощения при 289,70 и 351,89 нм, характерные для трииодидных форм. Длинноволновая полоса при 565,12 нм может быть связана с присутствием более высоких полииодидных ассоциатов и/или формированием комплексов с переносом заряда. Наличие органической полисахаридно-пептидной матрицы также может вносить вклад в поглощение в коротковолновой области спектр [203–207].

Таким образом, данные УФ-видимой спектроскопии согласуются с присутствием в составе КС-144 иодидных, трииодидных и полииодидных форм, а также указывают на возможное участие органической полисахаридно-пептидной матрицы в стабилизации иодсодержащих фрагментов. Наличие полос в области 290 и 352 нм является характерным спектральным признаком трииодид-иона, тогда как длинноволновая полоса в области 555 - 565 нм может

свидетельствовать о присутствии полииодидных ассоциатов и/или комплексов с переносом заряда. Полученные спектральные данные согласуются с предполагаемым комплексным характером КС-144 и обосновывают необходимость дальнейшего анализа структуры методами ИК- и Раман-спектроскопии.

3.3 Установление структуры КС-144

Структурную характеристику КС-144 проводили с использованием ИК- и Раман-спектроскопии. Эти методы позволяют оценить функциональный состав органической полисахаридно-пептидной матрицы, выявить признаки межмолекулярных взаимодействий и подтвердить наличие иодсодержащих фрагментов в комплексе.

На основании данных УФ-видимой спектроскопии и литературных данных можно предположить, что полипептидные фрагменты, содержащие карбоксильные, амино- и амидные группы, могут участвовать во взаимодействиях с иодсодержащими соединениями в составе КС-144. В качестве модели этого взаимодействия можно использовать образование иод-аминокислотного комплекса: $n*АК+I_2+KI \rightarrow [(АК)nK]^+ \bullet I_3^-$, где $n > 1$, что подтверждается результатами УФ-спектроскопии [208, 209]. В этом случае иодсодержащие фрагменты могут быть стабилизированы за счет донорно-акцепторных, ионных и водородных взаимодействий с функциональными группами органической матрицы.

Также возможно, что иод может взаимодействовать с аминогруппой образуя комплексы с ПЗ, которые доступны для исследований, например, ИК-спектроскопией. Например, амид аспарагиновой кислоты, т.е. аминокислота аспарагин образует комплекс с молекулярным иодом. Это доказывает красное смещение вибрации связи δN−H. Кроме этого наблюдается изменение частот колебаний связей C=C, C−C и δC−H. Таким образом, иод поляризует молекулу аспарагина, что приводит к появлению водородных и электростатических связей между молекулами этой аминокислоты [210].

3.3.1 ИК-спектроскопия КС-144

Метод ИК-спектроскопии широко используется в исследованиях по установлению структуры иод-полимерных комплексов и образованию в них новых связей, например, с хитозаном [211], арабиногалактаном [212] пирролопериленом [213] который, в частности, стал моделью изучения аморфного (непрозрачного) комплекса иода с амилозой с помощью рентгеновской кристаллографии. Аналогичный подход был применён в изучении образования комплекса иода в субстанции КС-144.

Было проведено исследование образцов трех серий КС-144 01090119, 02230519 и 03230819 методами молекулярной ИК спектроскопии в области 4000-650 $см^{-1}$ (рисунок 11).

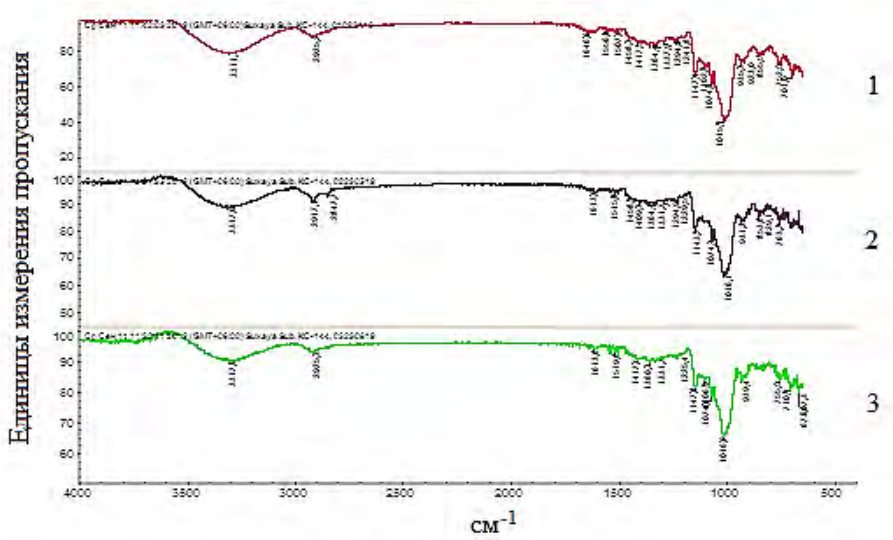


Рисунок 11 – Совмещенные ИК-спектры КС-144 серий 01090119, 02230519 и 03230819

При сравнении ИК-спектров различных серий КС-144 были обнаружены незначительные сдвиги полос поглощения, не превышающие ±12 см$^{-1}$. Это свидетельствует о сходстве функционального состава исследуемых серий и воспроизводимости спектральных характеристик полученного вещества. Характеристики основных полос поглощения и предлагаемые для них обозначения приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Характеристики ИК-спектра КС-144

Полоса, *ν*, см$^{-1}$	**Отнесение**
3322,4 ср.	νO–H, νN–H, водородные связи
2928,1 сл.	Внутрикомплексные соединения с водородной связью образованные с C=O, $\nu_{as}NH_3^+$ и $\nu_sNH_3^+$
1652,3 сл.	νN−H
1409,3 сл.	симметричные νCOO^- (Asp, Asn)
1360,3 сл.	δCH_2, ν_{as}C−O
1335,2 сл.	δC−H
1299,0 сл.	ν_sC−H
1240,0 сл.	Маятниковые колебания NH_3^+
1205,0 сл.	ν_{st}C–N
1148,4 ср.	Вибрационные колебания CH_2, ν_{as}C−O−C
1102,7 сл.	ν_{as}C−O−C
1074,7 ср.	Вибрационные колебания O−C и C−C
1017,7 с.	Деформационные колебания угла CCC
932,4 сл.	(930±4), связь α-1,4-глюканы
857,6 сл.	Скелетные колебания, δ C−H
758,6 сл.	(758±2), связь α-1,4-глюканы
705,7 ср.	Шумы, O···H···O

Поглощение более 10% наблюдается в областях 3600-3100 $см^{-1}$, что харктерно для валентных колебаний νO–H (3322 $см^{-1}$) в полимерах и νN−H в составе C–NH_2 аминокислот, также эта широкая интенсивная полоса указывает на межмолекулярные водородные связи в составе полисахаридно-пептидной матрицы. В этом диапазоне лежит νC=O, но сигнал более слабый. Ассоциация вызывает сдвиг полосы свободной группы N−H менее 3000 $см^{-1}$ за счёт образования водородной связи. Обычно это называют «аммонийной полосой». Типичное поглощение группы COO^- аминокислот происходит при 1530 и 1410 $см^{-1}$ и валентные колебания при 1630 $см^{-1}$ для NH_{3^+}. Наблюдаемое смещение до 1652,3 $см^{-1}$ указывает на комплексообразование по типу: NH_3^+ I_3^- [214]. Среднее поглощение, соответствующее длине волны 932,4 и 758,6 $см^{-1}$, довольно точно соотносится к связям α-1,4, но не α-1,3 или α-1,6, например в амилозе и декстрине. Поглощение при 705,7 $см^{-1}$ может быть соотнесено межмолекулярным водородным связям O···H···O декстрина, которые есть в и комплексе ПВП-иод [118].

Изучение других комплексов с ПЗ УФ- и ИК-спектроскопией $[(tryptophan\text{-}K)]^+ \cdot I_3^-$, $[(tyrosineK)]^+ \cdot I_3^-$, $[(glycine)]K^+ \cdot I_3^-$ и $[(alanine)]K^+ \cdot I_3^-$ показало, что протонированная аминогруппа образует комплекс с трииодидом [209,215].

Полученные изменения положения полос согласуются с возможным участием карбоксильных, аминных и амидных групп полипептидного компонента в межмолекулярных взаимодействиях с иодсодержащими фрагментами КС-144.

Сильное поглощение при 1148,4 $см^{-1}$ и очень сильное при 1017,7 $см^{-1}$ соответствует вибрации связей C–O–C, C–O, C–C в декстрине [216]. Полученные данные согласуются с гипотезой о комплексообразовании между органической матрицей и трииодидными/полииодидными фрагментами. При этом иод находится в гипервалентном состоянии с образованием донорно-акцепторной связи в полииодиде. Таким образом, данные ИК-спектроскопии подтверждают воспроизводимость полисахаридно-пептидной матрицы, функциональных групп, способных к водородным и донорно-акцепторным взаимодействиям в КС-144, а также спектральные характеристики исследуемой серии. Полученные данные согласуются с гипотезой о комплексообразовании между органической матрицей и трииодидными/полииодидными фрагментами.

3.3.2 Раман-спектроскопия КС-144

Раман-спектроскопию КС-144 проводили в лаборатории коллективного пользования НАО «Казахский национальный университет им. аль-Фараби» (рисунок 12).

Раман-спектроскопия является взаимодополняющим по отношению к ИК-спектроскопии колебательным методом: ИК-спектроскопия чувствительна к изменению дипольного момента, тогда как Раман-спектроскопия к изменению поляризуемости молекул [217–219].

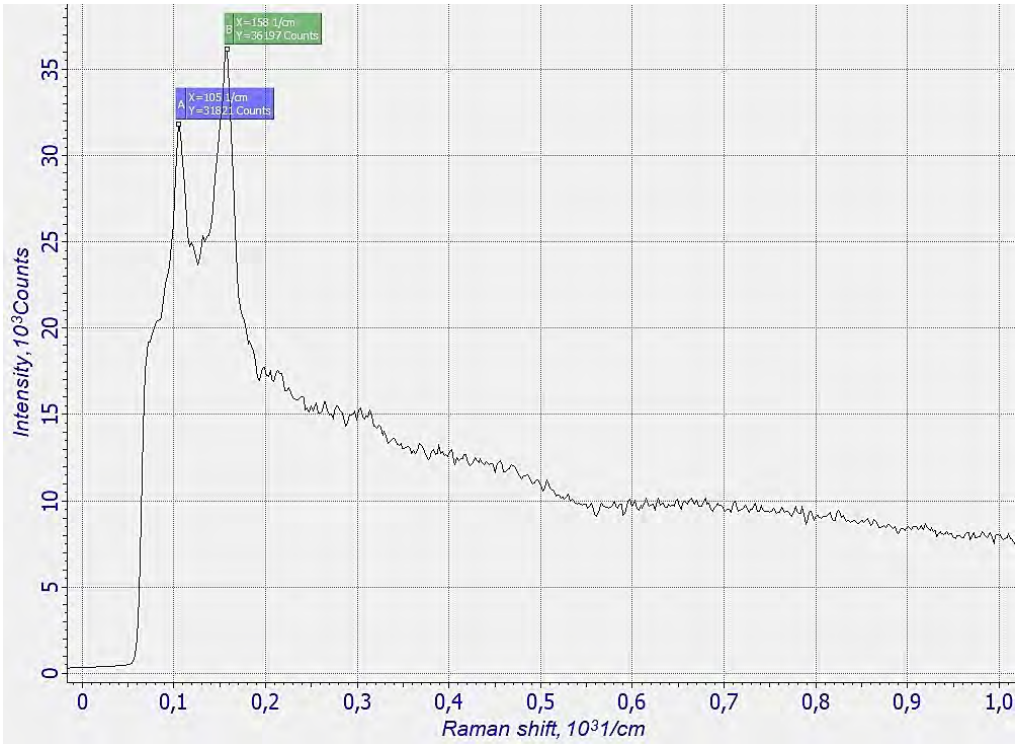


Рисунок 12 – Раман-спектроскопия КС-144

Раман-спектроскопия КС-144 указывает на присутствие в системе иодосодержащих полииодидных фрагментов, характерных для комплексов иода с амилозной или циклодекстриновой матрицей. Спектр комплекса амилоза-иод очень близок к спектру цепи $(I_5^-)_n$, стабилизированной в матрице тримезиновой кислоты [218], а также обнаруживает сходство со спектром, наблюдаемым в соединении $(\alpha\text{-CD})_2{\bullet}LiI_3{\bullet}I_2{\bullet}8\ H_2O$.

Левая спираль амилозы содержит центральный канал шириной 5Å, в котором размещаются атомы иода. Они явно не образуют исключительно полииодид $(I_3^-)_n$; следует допустить существование частиц вида $(I_3^-{\bullet}\ I_2)_n$, $(I_2{\bullet}I^-{\bullet}I_2)_n$, или $(I_5^-)_n$, возможно даже $(I_2{\bullet}I^-{\bullet}I_2)$ или (I_7^-), как это наблюдается в комплексе с β-CD. Зигзагообразная группировка I_7^- могла бы легко выпрямиться, чтобы поместиться в более узком канале, образованном α-CD или спиралью амилозы. Вполне возможно, что фрагменты I_5^-, обнаруженные в комплексах с α-CD и тримезиновой кислотой, являются артефактом, обусловленным периодичностью 15,5Å окружающих матриц. Поэтому необходимо соблюдать осторожность при экстраполяции данных, полученных при исследовании монокристаллов, на линейную бесконечную спираль амилозы, где фактический период повторяемости составляет 8Å на 6 глюкозных остатков, или 1,33Å.

Однако в настоящее время мы должны исходить из того, что частицей иода, фактически участвующей в комплексе амилоза-иод, является I_5^-, о чём свидетельствуют кристаллографические, Раман-спектроскопические, а также ^{129}I Мессбауэровские спектроскопические исследования. Однако современные исследования и обзоры показывают, что структура комплекса амилоза–иод, вероятно, является более сложной и может включать смесь I_2, I_3^-, I_5^- и более

протяженных иодных фрагментов, формирующих внутри спирали амилозы повторяющиеся мотивы смешанного состава. В настоящее время одной из наиболее обоснованных моделей синего иод-крахмального комплекса считается мотив типа I_2–I_5^-–I_2, тогда как отнесение всех спектральных характеристик исключительно к одной форме I_5^- требует осторожности [219–221]. В случае КС-144 данные Раман-спектроскопии следует рассматривать как подтверждение присутствия полииодидных фрагментов и их стабилизации полисахаридно-пептидной матрицей, а не как доказательство существования только одного типа иодсодержащей частицы.

аким образом, объединенные данные УФ-видимой, ИК- и Раман-спектроскопии характеризуют сложную природу КС-144. УФ-видимая спектроскопия согласуется с присутствием иодидных, трииодидных и полииодидных форм; ИК-спектроскопия подтверждает наличие полисахаридно-пептидной матрицы и функциональных групп, способных участвовать в водородных и донорно-акцепторных взаимодействиях; данные Раман-спектроскопии согласуются с присутствием полииодидных фрагментов. Полученные спектральные данные согласуются с представлением о КС-144 как иодсодержащем координационном соединении, в котором иодсодержащие формы стабилизируются органической полисахаридно-пептидной матрицей.

3.4 Стабильность координационного соединения иода

Исследование стабильности лекарственного вещества является необходимым этапом при фармацевтической разработке, поскольку позволяет обосновать условия хранения, оценить сохранность ключевых показателей качества и получить данные для обоснования срока хранения вещества.

Для оценки стабильности вещества КС-144 проводили долгосрочные испытания в режиме реального времени по ключевым показателям качества. Полученные данные могут быть использованы для обоснования условий хранения КС-144 в период фармацевтической разработки, а также при последующем контроле качества субстанции.

В исследование были включены три лабораторные серии КС-144, полученных в АО «НЦПП» (Алматы). Испытания проводили в первичной упаковке, используемой для хранения субстанции: флаконы из темного стекла FV-50 согласно ОСТ 64-282-85, закрытые полиэтиленовой пробкой и завинчивающейся крышкой согласно ОСТ 64-2-87-81. Исследуемые серии хранили при температуре 25±2°C и относительной влажности 60±5%. Аналитический контроль проводили в исходной точке и в установленные сроки хранения до 12 месяцев в зависимости от серии [222].

Субстанцию КС-144 исследовали по следующим показателям качества: описание, идентификация иода и иодидов, количественное содержание иода и иодида, растворимость в воде, температура плавления, pH, потеря в массе при высушивании и микробиологическая чистота. Выбор указанных показателей обусловлен физико-химическими характеристиками КС-144 и необходимостью

контроля сохранности иодсодержащих компонентов и основных показателей качества в процессе хранения.

В течение исследованного периода хранения контролируемые показатели качества КС-144 в целом сохранялись в установленных пределах. Существенных изменений внешнего вида, растворимости и других контролируемых физико-химических характеристик не наблюдалось. Результаты испытаний представлены в Приложении Л.

Стабильность показателей трех исследованных серий свидетельствует о том, что выбранная первичная упаковка защищает вещество на необходимом уровне от воздействия факторов окружающей среды в течение указанного периода мониторинга. Показатели микробиологической чистоты также не претерпели существенных изменений и соответствовали установленным нормам. Результаты исследования подтверждают рациональность состава КС-144, воспроизводимость технологии и пригодность выбранных условий хранения для обеспечения стабильности КС-144 в течение 12 месяцев.

Долгосрочное исследование стабильности КС-144 проводилось в соответствии с требованиями приказа Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020, Государственной фармакопеи Республики Казахстан и руководства ICH Q1A(R2) по изучению стабильности новых лекарственных веществ и лекарственных препаратов [223] (таблица 8).

Таблица 8 – Качественные и количественные показатели стабильности субстанции КС-144 при 25 ± 2°С и 60 ± 5% RH

Показатель качества	**Методика испытаний**	**Предлагаемая норма**	**Интервал хранения, мес.**				
			0	3	6	9	12
Описание	Органолептически	Темный порошок коричнево-фиолетового цвета со слабым запахом иода	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация иода	ГФ РК, т. 2, с. 248	Выделение фиолетовых паров иода	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация иодидов	ГФ РК, т. 1, 2.3.1	Образование светло-желтого творожистого осадка	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Растворимость в воде	ГФ РК, т. 1, с.25	1,0 г/20 мл	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Микробиологическая чистота	ГФ РК, т. 1, 2.6.12 ГФ РК, т. 1, 2.6.12 ГФ РК, т. 1, 2.6.13	Субстанция должна соответствовать требованиям ГФ РК, т. 1, категория 3А. В препарате допускается наличие не более 1000 аэробных бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). В 1 г препарата не допускается наличие *Escherichia coli*	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Температура плавления	ГФ РК т. 1, 2.2.14	215 - 225°С	223	220	218	216	219
Потеря в массе при высушивании, %	ГФ РК т. 1, 2.2.32	≤ 3,0	1,03	1,09	1,08	1,03	1,12
pH	ГФ РК, т. 1, 2.2.3	1,5 - 6,5	4,69	4,81	4,84	4,85	4,84
Кинематическая вязкость, $мм^2/с$	ГФ РК т.1, 2.2.8 и 2.2.9	1,110 - 1,230	1,118	1,111	1,125	1,118	1,135
Количественное содержание иода, %	ЕФ 6 изд, 2.2.47	0,70 - 0,80	0,713	0,746	0,753	0,755	0,756
Количественное содержание иодида, %	ЕФ 6 изд, 2.2.47	0,85 - 1,20	1,072	0,872	1,161	1,106	1,096
Примечание – Соотв. — соответствует требованиям спецификации стабильности.							

Контролируемые показатели качества исследованных серий КС-144, включая описание, содержание иода и иодида, растворимость, pH и потерю в массе при высушивании, в исследованные сроки хранения оставались в установленных пределах. Подробные данные приведены в Приложении К и Приложение Л.

Спектроскопические исследования представляют формирование полукристаллической супрамолекулярной структуры, в которой иодсодержащие частицы существуют как в связанном, так и в кристаллическом состоянии. Характерные полосы поглощения в области 194 - 450 нм, отклонения химических сдвигов и дифракционные пики, соответствуют фазам LiI и LiI•I_2, в совокупности указывают на комплексообразование между иодом, литием и декстрином посредством нековалентных и координационных взаимодействий. Термический анализ выявил двухстадийный процесс деградации с точкой плавления 169,6°C и общей потерей массы около 61,5%, что подтверждает высокую чистоту и улучшенную термическую стабильность комплекса по сравнению с нативным декстрином.

Результаты исследований стабильности субстанции КС-144 показали, что КС-144 сохраняет контролируемые параметры качества в пределах требований спецификации при хранении при температуре 25±2°C и относительной влажности 60±5% [224]. Отсутствие существенных изменений физико-химических и микробиологических параметров в течение контрольного периода позволяет установить срок хранения субстанции КС-144 в течение 12 месяцев.

3.5 Оценка цитотоксической активности различных серий КС-144

Цитотоксическая активность КС-144 была оценена на клеточной линии МеТ-5А (SV40 Tag – иммортализованные клетки мезотелиомы, ATCC-CRL-9444). В исследование были включены серии КС-144 № 01090119, № 02230519 и № 03230819. В качестве референтного иодосодержащего вещества использовали коммерческий препарат для наружного и местного применения «Повидон-йод-ДФ» (DOSFARM, Казахстан) [225]. В качестве контрольного соединение использовали цисплатин дигидрохлорид (C2210000, Sigma-Aldrich, США).

Цитотоксическая активность исследуемых веществ оценивали МТТ методом. Клетки МеТ-5А инкубировали с исследуемыми образцами в течение 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часов. Для каждого временного интервала определяли $ЦТК_{50}$ (концентрация снижающая жизнеспособность клеток на 50%). Расчет значений $ЦТК_{50}$ проводили в программе GraphPad Prism 6 с учетом трехкратного повторения экспериментов. Для оценки зависимости значений $ЦТК_{50}$ от длительности воздействия использовали регрессионный анализ.

В таблице 9 представлены значения $ЦТК_{50}$ для трех серий соединений КС-144 и ПВП-иода при различном времени воздействия на клеточную линию МеТ-5А.

Таблица 9 – Значения $ЦТК_{50}$ для серии КС-144 и ПВП-иода на клеточной линии МеТ-5А (мг/мл)

Вещество	**Время воздействия исследуемых веществ, ч**						**Ср. Знач. $ЦТК_{50}$**
	3	**6**	**12**	**24**	**48**	**72**	
КС-144 (01090119)	0,50±0,14	0,39±0,11	0,49±0,11	0,51±0,15	0,42±0,06	0,41±0,12	**0,45±0,12**
КС-144 (02230519)	0,52±0,21	0,45±0,10	0,53±0,15	0,56±0,08	0,50±0,16	0,37±0,08	**0,49±0,13**
КС-144 (03230819)	0,41±0,09	0,45±0,13	0,45±0,10	0,40±0,10	0,44±0,12	0,38±0,15	**0,42±0,15**
ПВП-иод	0,21±0,04	0,25±0,03	0,20±0,06	0,22±0,05	0,17±0,12	0,16±0,08	**0,20±0,07***
Цисплатин (мкг/мл)	4,21±0,01	3,52±0,02	3,31±0,02	3,12±0,02	3,22±0,02	2,83±0,01	**3,37±0,47***
Примечание - * $p<0,05$ по сравнению с сериями КС-144.							

Результаты исследования показали, что все три серии соединения КС-144 обладают сопоставимой цитотоксической активностью в отношении клеточной линии МеТ-5А. Средние значения $ЦТК_{50}$ для серии КС-144 находились в близком диапазоне и составляли 0,45±0,12 мг/мл для серии № 01090119, 0,49±0,13мг/мл для серии № 02230519 и 0,42±0,15 мг/мл для серии № 03230819. Полученные данные указывают на воспроизводимость цитотоксических характеристик соединения КС-144 среди исследованных серий.

Цитотоксическая активность ПВП-иода была выше по сравнению с серией КС-144: среднее значение $ЦТК_{50}$ составило 0,20±0,07 мг/мл. Это указывает на то, что жизнеспособность клеток МеТ-5А под воздействием ПВП-иода более выражена, чем у исследованной серии КС-144.

Графики линейной регрессии зависимости $ЦТК_{50}$ от времени воздействия для серий КС-144 и ПВП-иода показаны на рисунке 13.

Полученные данные показали, что серии КС-144 характеризуются более низкой цитотоксической активностью в отношении клеток МеТ-5А по сравнению с ПВП-иодом. Эти результаты доказывают зависимость токсичности соединений иода от природы координирующих лигандов [145, 226].

Кроме того, иммортализованные нормальные клетки оказались более чувствительными к ПВП-иоду, чем, например, фибробласты мышей [227] или клетки нейробластомы человека SH-SY5Y [228], для которых значения ЦТК50 составили, 4,75 и 1,1 мг/мл, соответственно.

С учетом полученных результатов для дальнейших исследований цитотоксической активности КС-144 был выбран 24-часовой интервал инкубации. Выбор данного временного интервала обусловлен тем, что при 24-часовом воздействии формировался выраженный дозозависимый эффект, достаточный для построения кривых «доза–эффект» и сопоставления активности различных серий КС-144. Кроме того, 24-часовая экспозиция является методически удобной для последующего сравнения с другими клеточными

тестами, направленными на оценку пролиферации, апоптоза, митохондриальной дисфункции и окислительного стресса.

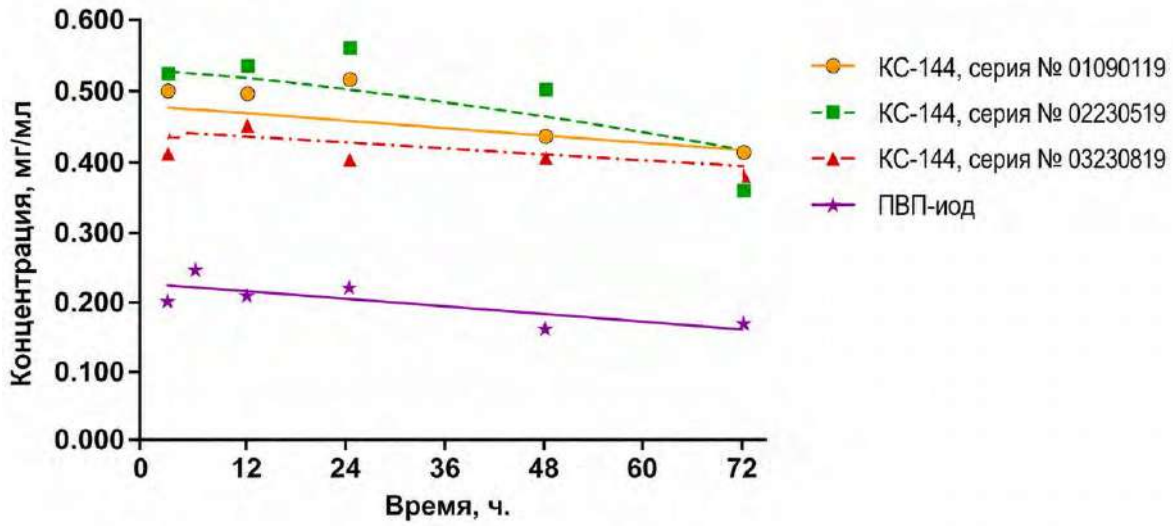


Рисунок 13 – Линейная регрессия $ЦТК_{50}$ от времени воздействия для трех серий КС-144 и ПВП-иода на клеточной линии МеТ-5А

На рисунке 14 представлены кривые зависимости «доза–эффект» для трех серий КС-144 и ПВП-иода в логарифмическом масштабе после 24 ч воздействия на иммортализованные нормальные клетки МеТ-5А.

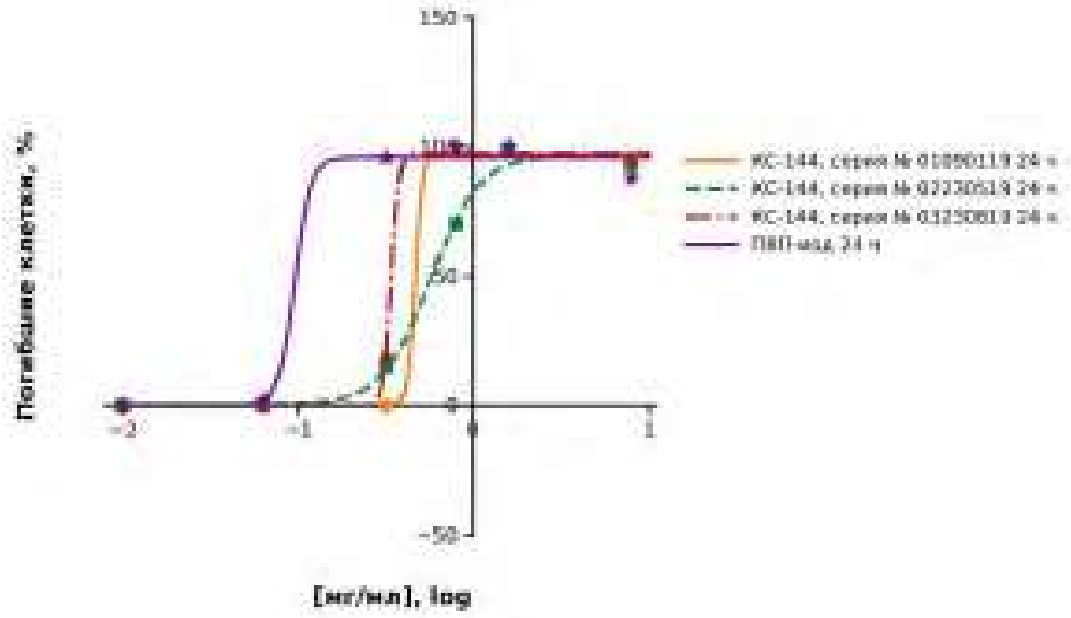


Рисунок 14 – Log-кривые «доза-эффект» для серий КС-144 и ПВП-иода после 24 часов воздействия на культуре клеток МеТ-5А

Log-кривые «доза–эффект» для серий КС-144 и ПВП-иода характеризовались типичной сигмоидной формой. При этом серии КС-144

показала аналогичный цитотоксической активностью на клеточной линии МеТ-5А, что подтверждает воспроизводимость биологических свойств исследуемого соединения в разных сериях синтеза. Более выраженный цитотоксический эффект ПВП-иода по сравнению с КС-144 может быть связан с различиями в доступности активных форм иода и особенностями взаимодействия иодированного соединения с клеточными структурами. ПВП-иод представляет собой иодофорный комплекс, в котором цитотоксический эффект в значительной степени определяется доступностью свободных/реактивных форм иода. В эукариотических клетках было показано, что ПВП-иод вызывает повреждение клеточной мембраны, нарушение митохондриального мембранного потенциала и снижение барьерной функции клеточного монослоя [229]. Следовательно, более высокий цитотоксический эффект ПВП-иода *in vitro* может отражать прямое взаимодействие реактивных форм иода с мембраной и внутриклеточными структурами по сравнению с координированно связанным иодом в КС-144.

3.6 Изучение цитотоксичности КС-144 на различных линиях опухолевых клеток

Цитотоксичность это один из основных параметров биологической активности и эффективности противоопухолевых средств. Идеальным вариантом является высокая избирательное действие. Однако не всегда удается этого достичь. Классические противоопухолевые препараты характеризуются высокой токсичностью и способностью вызывать другие формы рака [230]. Для часто используемых доксорубицина и цисплатина показана прямая зависимость повреждающих эффектов от дозы [231, 232]. Поэтому изучение циотоксичности, включая комбинацию с другими препаратами позволят изучить возможные механизмы взаимодействия лекарственных средств.

Изучение цитотоксической активности КС-144 на опухолевых и нормальных клеточных линиях проводили реагентом EZ4U или с применением МТТ-теста, наиболее доступный и часто используемый для оценки прямого цитотоксического действия потенциальных кандидатов в противоопухолевые препараты [233]. Однако, способы расчета цитотоксической концентрации, приводящей к 50% гибели клеток могут сильно отличаться, от простой линейной интерполяции, до применения логистической модели, основанной на четырех параметрах - минимальный и максимальный эффект, $ЦТК_{50}$ и tg угла наклона кривой [182].

Было проведено исследование по определению цитотоксического действия КС-144 в отношении различных клеточных линий. Тестовыми системами служили суспензионные клеточные линии (К562 и Raji) и адгезивные формы клеток (AGS, HepG2, MiaPaCa2, P31, P31res1.2, MCF-7 и ZR-75-1). Исследования на клетках чувствительной и устойчивой к цисплатину мезотелиомы (P31 и P31res1.2) и молочной железы (MCF-7 и ZR-75-1). проводились на базе Медицинского Университета Вены в лаборатории д-ра М. Груша (г. Вена, Австрия). Использовали контрольные клеточные линии MDCK (*madin darbin canin kidney,*

эпителиальные клетки почки собаки), MeT-5A (SV40 Tag – иммортализованные клетки мезотелиомы, ATCC-CRL-9444).

На клетки воздействовали в течение 24 ч КС-144 в концентрациях от 5,0 мг/мл до 0,01 мкг/мл. Диапазон концентраций для противоопухолевых веществ составил от 0,15 до 333 мкг/мл. В результате проведенного исследования было показано, что КС-144 оказывает ингибирующее действие на пролиферацию исследуемых раковых клеток. Также проанализированы действия опухолевых препаратов, доксорубицин и цисплатин, на различных клеточных линиях. Цитотоксическое действие оценивали МТТ-тестом и/или EZ4U, результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Значения $ЦТК_{50}$ (мг/мл) лекарственной субстанции КС-144, доксорубицина и цисплатина для ингибирования роста различных типах и линий опухолевых клеток

Клеточная линия	**Исследуемые вещества**		
	КС-144 (мг/мл)	**Доксорубицин (мкг/мл)**	**Цисплатин (мкг/мл)**
Суспензионные культуры			
K562	0,309±0,036	0,020±0,001	30,005±0,010
Raji	0,195±0,016	0,020±0,008	3,601±0,001
Адгезивные культуры			
MDCK	0,401±0,150	0,021±0,001	6,301±0,016
MeT-5A	1,370±0,203	0,012±0,001	3,901±0,014
P31	0,306±0,052*	0,019±0,003	17,403±0,027
P31res1.2	0,465±0,167*	0,014±0,001	168,028±0,030
AGS	0,580±0,003	0,013±0,005	12,602±0,006
MiaPaCa2	0,516±0,086	0,012±0,002	22,204±0,015
HepG2	0,535±0,066	0,011±0,001	6,901±0,013
HeLa	0,686±0,017	0,013±0,009	6,301±0,006
MCF-7	0,489±0,144	0,021±0,0025	30,005±0,017
ZR-75-1	0,479±0,025	0,020±0,003	3,301±0,012
Примечание - (*p<0,05 по сравнению с контролем MeT-5A)			

В качестве моделей нормальных клеток использовались MeT-5A и MDCK. Сравнение значений $ЦТК_{50}$, полученных в нормальных и опухолевых клеточных линиях, позволяет оценить степень цитотоксичности исследуемых веществ, а также их селективность, что является важным критерием для определения приемлемости для дальнейшего применения анализируемых веществ.

По данным таблицы 9, субстанция КС-144 проявила цитотоксическую активность в отношении всех исследованных клеточных линий. Значения $ЦТК_{50}$ для КС-144 составили от 0,170±0,035 до 1,370±0,203 мг/мл. Статистический анализ с учетом нормальности распределения данных, по критерию Шапиро-Уилка показал, что наиболее чувствительными клеточными линиями к действию

КС-144 среди суспензионных культур оказались клетки Raji и K562, тогда как среди адгезивных культур более выраженный эффект наблюдался в отношении клеток P31, MDCK, P31res1.2, ZR-75-1 и MCF-7. Наименьшую чувствительность к КС-144 продемонстрировали клетки MeT-5A, для которых значение $ЦТК_{50}$ составило 1,370±0,203 мг/мл.

Относительно высокая чувствительность суспензионных клеток в сравнении с адгезивными к КС-144 наблюдалась только в сравнении с MeT-5A ($p = 0,0001$). Наименьшая концентрация $ЦТК_{50}$ КС-144 для P31 отличалась в сравнении с линией HeLa ($p = 0,0003$), но не для P31res1.2 ($p = 0,19$). Отсутствие значимого различия между P31 и P31res1.2 предполагает, что цитотоксический эффект КС-144 может быть не напрямую связан с механизмами, обеспечивающими приобретенную устойчивость линии P31res1.2 к цисплатину.

Этот вывод подтверждается тем фактом, что линия P31res1.2 продемонстрировала явную устойчивость к цисплатину по сравнению с исходной чувствительной к цисплатину линией P31 ($p = 0,01$), в то время как для КС-144 такой разницы в устойчивости между двумя линиями не наблюдалось. Клеточния линия P31res1.2 описана в литературе как устойчивый к цисплатину производный вариант линии P31, полученный путем селекции *in vitro* с использованием цисплатина, что делает эту модель перспективным кандидатом для анализа соединений, сохраняющих активность в присутствии устойчивости к платине [234].

Механизм цитотоксического действия КС-144 может отличаться от механизма действия классических цитостатиков. Цисплатин оказывает противоопухолевое действие главным образом за счет образования ДНК-аддуктов и внутри- и межцепочечных ДНК-сшивок, которые нарушают репликацию и транскрипцию ДНК и активируют апоптотические сигнальные пути [235, 236]. Доксорубицин, в свою очередь, как антрациклин, оказывает свое действие за счет интеркаляции ДНК, ингибирования фермента топоизомеразы II, повреждения ДНК и индукции апоптоза [237, 238]. В отличие от этих препаратов, молекулярный иод и иодированные соединения, как было описано, взаимодействуют с липидами и белками, нарушают митохондриальный мембранный потенциал, изменяют окислительно-восстановительный баланс, снижают уровень клеточных тиолов и индуцируют апоптоз [78, 239]. Следовательно, прямая цитотоксичность КС-144 при высоких концентрациях не может считаться единственным механизмом его противоопухолевого действия. Более важно определить апоптоз-индуцирующие свойства КС-144 при концентрациях ниже $ЦТК_{50}$, а также его способность усиливать действие стандартных цитостатиков.

В модели мезотелиомы клетки P31 и P31res1.2 были более чувствительны к КС-144, чем нормальные мезотелиальные клетки MeT-5A. Это указывает на умеренную селективность КС-144 в отношении опухолевых мезотелиальных клеток. Опубликованные данные также показывают, что значения $ЦТК_{50}$ для КС-144 близки друг к другу в линиях P31 и P31res1.2, в то время как значение $ЦТК_{50}$ для MeT-5A выше, что дополнительно подтверждает сохранение активности

соединения в модели, устойчивой к цисплатину. Для доксорубицина и цисплатина подобная закономерность была выражена значительно слабее, поскольку их цитотоксическое действие распространялось как на опухолевые, так и на нормальные клетки в близких или даже более низких концентрациях. Таким образом, несмотря на то, что значения $ЦТК_{50}$ КС-144 были выше, чем у стандартных цитостатиков, полученные данные оправдывают дальнейшее изучение КС-144 не только как монопрепарата, но и как потенциального компонента комбинированного действия с доксорубицином и цисплатином.

По результатам исследования КС-144 проявляет ингибирующую активность как против чувствительной к цисплатину клеточной линии мезотелиомы Р31, так и против ее устойчивой к цисплатину формы Р31res1.2. Тот факт, что КС-144 сохранил свою цитотоксическую активность в резистентной модели, представляет научный интерес, поскольку предполагает, что его механизмы действия могут частично отличаться от классического механизма повреждения ДНК платиной. В связи с этим клеточные линии Р31 и Р31res1.2 были использованы в качестве экспериментальных моделей для дальнейшего изучения механизма противоопухолевого действия КС-144 *in vitro*.

3.7 Комбинированное действие КС-144 с противоопухолевыми препаратами *in vitro*

Следующим этапом исследования противоопухолевой активности нового КС-144 является оценка эффективности в комбинации с классическими противоопухолевыми препаратами, доксорубицином и цисплатином. Комбинированная терапия в онкологии позволяет достичь терапевтического отклика при использовании более низких доз противоопухолевых препаратов, это важно для снижения токсичности и преодоления лекарственной устойчивости [240]. Наличие потенцирующих свойств оценивали на опухолевых клеточных линиях в опытах *in vitro*. При этом их комбинация может проявляться как антагонизм, синергизм или аддитивность [241]. Метод основан на подавлении жизнеспособности раковых клеток препаратами, при их одновременном внесении, с последующим проведением МТТ теста. Концентрации для анализа комплексного действия КС-144 и противоопухолевых препаратов избиралось из цитотоксической дозы, приводящей к 50% гибели клеток ($ЦТК_{50}$) (таблица 10). Вещества вносились однократно в шахматном порядке с двукратным уменьшением доз как КС-144, так и противоопухолевых препаратов, с последующим расчетом индекса фракционной ингибирующей концентрации (FIC). Критерием синергизма считали значения $FIC \leq 0,5$, интервал 0,51 - 4,0 расценивали как индифферентное действие, а $FIC \geq 4,1$ как антагонизм.

Концентрации для анализа выбирались на основе предварительно определенных цитотоксических концентраций при моновоздействии исследуемых веществ. Для клеточной линии К562: $ЦТК_{50}$ КС-144 - 309 мкг/мл, $ЦТК_{50}$ доксорубицина - 20 мкг/мл; для линии Р31 $ЦТК_{50}$ КС-144 составила 306

мкг/мл, цисплатина - 5 мкг/мл, и цисплатин-резистентной линии мезотелиомы P31res1.2 $ЦТК_{50}$ КС-144 - 465 мкг/мл, цисплатина - 55 мкг/мл.

При исследовании на клеточной линии лейкемии К562 установлено, что КС-144 способен потенцировать цитотоксическое действие доксорубицина при совместном применении. Выраженный синергический эффект был выявлен при сочетании КС-144 с доксорубицином, что подтверждалось значениями индекса фракционной ингибирующей концентрации FIC ≤ 0,5 (таблица 11). Синергизм регистрировался уже в диапазоне низких концентраций доксорубицина 6 - 13 мкг/мл при сочетании с КС-144 в концентрации 75 мкг/мл; значения FIC находились в пределах 0,472 - 0,498.

Таблица 11 – Совместное действие КС-144 и доксорубицин после 24 ч воздействия на К562

	309	КС-144 (мкг/мл)										
20	FIC	**0**	**0,6**	**1,3**	**2,5**	**5**	**10**	**20**	**40**	**75**	**150**	**300**
Доксорубицин (мкг/мл)	**0**	0,843	0,839	0,880	0,858	0,897	0,886	0,866	0,875	0,794	0,804	1,096
	0,8	0,665	0,661	0,702	0,680	0,719	0,708	0,688	0,697	0,616	0,626	0,918
	1,5	0,585	0,581	0,622	0,600	0,639	0,628	0,608	0,617	0,536	0,546	0,838
	3,0	0,550	0,545	0,587	0,565	0,604	0,592	0,572	0,582	0,501	0,511	0,803
	6,0	0,547	0,543	0,584	0,562	0,601	0,590	0,570	0,579	0,498	0,508	0,800
	13	0,521	0,517	0,558	0,536	0,575	0,564	0,544	0,553	0,472	0,483	0,774
	25	0,580	0,576	0,617	0,596	0,635	0,623	0,603	0,613	0,532	0,542	0,834
	50	0,096	0,091	0,133	0,111	0,150	0,139	0,118	0,128	0,047	0,057	0,349

Примечание - представлены значения индекса FIC. Интерпретация: FIC ≤ 0,5 - синергизм; FIC 0,51 - 4,0 - индифферентное действие; FIC ≥ 4,1 - антагонизм.

Примечательно, что при комбинированном воздействии КС-144 и доксорубицина на клетки К562 синергический эффект регистрировался в отдельных сочетаниях концентраций. Наиболее выраженный синергизм отмечался при сочетании КС-144 в концентрации 75 мкг/мл с доксорубицином в концентрациях 6 - 13 мкг/мл, где значения индекса FIC находились в пределах 0,472 - 0,498. Эти данные свидетельствуют о том, что КС-144 способен усиливать цитотоксическое действие доксорубицина в клеточной линии К562 и снижать эффективную концентрацию доксорубицина относительно его $ЦТК_{50}$.

С учетом значения $ЦТК_{50}$ доксорубицина 20 мкг/мл, выявленный синергизм при концентрациях 6 - 13 мкг/мл указывает на возможность снижения эффективной концентрации цитостатика примерно в 1,5 - 3,3 раза в условиях данной клеточной модели.

При исследовании комбинации КС-144 с цисплатином на клеточной линии мезотелиомы P31 также был установлен синергический эффект (таблица 12), однако он носил локальный характер. Значения FIC ≤ 0,5 регистрировались только при концентрации цисплатина 5,0 мкмоль/л в сочетании с КС-144 в диапазоне концентраций 75 - 300 мкг/мл. В этих точках индекс FIC составлял 0,450 - 0,457, что указывает на способность КС-144 усиливать цитотоксический эффект цисплатина в данной клеточной модели. При других исследованных

сочетаниях концентраций наблюдалось преимущественно индифферентное (аддитивное) действие без признаков антагонизма.

Таблица 12 – Совместное действие КС-144 и цисплатина после 24 ч воздействия на Р31

	306	КС-144 (мкг/мл)										
17,4	FIC	**0**	**0,6**	**1,3**	**2,5**	**5**	**10**	**20**	**40**	**75**	**150**	**300**
Цисплатин (мкг/мл)	**0**	1,169	1,233	1,129	1,173	1,232	1,181	1,071	1,073	1,005	1,006	0,931
	0,6	1,096	1,160	1,056	1,100	1,159	1,108	0,998	1,000	0,932	0,933	0,858
	1,25	1,069	1,133	1,029	1,073	1,132	1,081	0,971	0,973	0,905	0,906	0,831
	2,5	0,916	0,979	0,876	0,920	0,979	0,928	0,817	0,819	0,752	0,753	0,677
	5,0	0,768	0,832	0,728	0,772	0,831	0,780	0,670	0,671	0,604	0,605	0,530
	10,0	0,614	0,677	0,574	0,618	0,677	0,626	0,515	0,517	0,450	0,451	0,457
	20,0	0,776	0,839	0,736	0,780	0,838	0,788	0,677	0,679	0,612	0,613	0,279

Примечание - представлены значения индекса FIC. Интерпретация: FIC ≤ 0,5 - синергизм; FIC 0,51 - 4,0 - индифферентное действие; FIC ≥ 4,1 - антагонизм.

Особый интерес представляют данные на цисплатин-устойчивой линии мезотелиомы P31res1.2 (таблица 13). В отличие от чувствительной линии, в данной клеточной модели синергический эффект КС-144 с цисплатином проявлялся в более широком диапазоне концентраций. Совместное действие КС-144 и цисплатина приводило к синергизму (FIC ≤ 0,5) при концентрациях цисплатина от 6 до 50 мкг/мл и КС-144 от 75 до 300 мкг/мл.

Таблица 13 – Совместное действие КС-144 и цисплатин после 24 ч воздействия на P31res1.2

	465	КС-144 (мкг/мл)										
168	FIC	**0**	**0,6**	**1,3**	**2,5**	**5**	**10**	**20**	**40**	**75**	**150**	**300**
Цисплатин(мкг/мл)	**0**	0,984	1,047	0,944	0,988	1,047	0,996	0,885	0,887	0,820	0,821	0,745
	3,0	0,928	0,991	0,888	0,932	0,990	0,939	0,829	0,831	0,764	0,765	0,689
	6,0	0,907	0,970	0,867	0,911	0,970	0,919	0,808	0,810	0,743	0,744	0,668
	13	0,789	0,852	0,749	0,793	0,852	0,801	0,690	0,692	0,625	0,626	0,550
	25	0,675	0,739	0,635	0,679	0,738	0,687	0,577	0,578	0,511	0,512	0,437
	50	0,619	0,683	0,579	0,623	0,682	0,631	0,521	0,523	0,455	0,456	0,381
	100	0,681	0,744	0,641	0,685	0,744	0,693	0,582	0,584	0,517	0,518	0,442
	200	0,556	0,620	0,516	0,560	0,619	0,568	0,458	0,460	0,392	0,393	0,318

Примечание - представлены значения индекса FIC. Интерпретация: FIC ≤ 0,5 - синергизм; FIC 0,51–4,0 - индифферентное действие; FIC ≥ 4,1 - антагонизм.

Синергизм отмечался при сочетании цисплатина в концентрациях 13 - 300 мкг/мл с КС-144 в высоких концентрациях продемонстрировало стабильный синергизм. Минимальные значения FIC зарегистрированы при комбинациях 25 мкг/мл цисплатина + 300 мкг/мл КС-144 (FIC = 0,381). Значения, полученные при концентрации цисплатина 200 мкг/мл, требуют осторожной интерпретации, поскольку такая концентрация может превышать цитотоксический порог для данной клеточной линии. Поэтому для оценки

комбинированного действия КС-144 и цисплатина наиболее информативными следует считать сочетания, находящиеся в пределах субцитотоксических или околоцитотоксических концентраций. Полученные данные свидетельствуют о том, что КС-144 способен усиливать цитотоксическое действие цисплатина на цисплатин-резистентной линии P31res1.2.

В исследованных комбинациях соединения КС-144 с доксорубицином и цисплатином по индикатору FIC не было обнаружено признаков антагонистического взаимодействия. При этом синергический эффект наблюдался преимущественно при отдельных комбинациях различных концентраций и зависел от типа клеточной линии, а также от используемого цитостатика. В линии K562 синергизм наблюдался при использовании КС-144 в комбинации с доксорубицином, тогда как в линиях мезотелиомы P31 и P31res1.2 синергический эффект был зафиксирован при комбинированном действии КС-144 и цисплатина. Более выраженное расширение спектра синергических комбинаций в линии P31res1.2 представляет особый интерес, поскольку эта клеточная линия характеризуется устойчивостью к цисплатину.

Отсутствие антагонизма (FIC ≥ 4,1) во всех протестированных комбинациях указывает на отсутствие неблагоприятного взаимодействия по цитотоксическому эффекту в условиях *in vitro* модели. При этом синергический эффект в большей степени наблюдался для линии K562, что согласуется с данными о чувствительности этой линии к комбинированным воздействиям, например, иматиниба и цисплатина [242]. Индукторы АФК, например Levistolide A, в сочетании с доксорубицином также проявляют синергический эффект в отношении клеток K562 [243]. Весьма вероятно, что КС-144 действует по схожему механизму: влияя на уровень продукции АФК и истощая антиоксидантный резерв опухолевой клетки, он провоцирует усиленный цитотоксический ответ.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с актуальными данными о применении галогенсодержащих соединений в онкологии. В частности, подтверждена высокая эффективность использования препаратов молекулярного иода в комбинации с доксорубицином в рамках неоадъювантной терапии рака молочной железы [244]. Аналогичные результаты были получены на модели асцитного рака мышей BALB/c, вызванного клетками рака толстого кишечника CT26 и печени H22, в комбинации ПВП-иода с цисплатином и 5-фторурацилом. В результате, также происходило ингибирование SOD и увеличение апоптотического индекса [245]. Результаты этих исследований указывают, что одним из возможных механизмов усиления действия цитостатиков является повышение чувствительности опухолевых клеток к окислительному стрессу и запуску апоптотических процессов.

3.8 Проапоптогенная и апоптотическая активность

В свете предыдущих исследований и данных литературы были проведены исследования по изучению проапоптогенной активности КС-144 на линиях клеток K562 и P31res1.2. Для исследования был выбран широкий диапазон диапазон

концентраций КС-144 и контрольного препарата ПВП-иод составлял от 0,063 до 0,5 мг/мл. Оценку апоптотических изменений проводили методом проточной цитометрии с последующим сопоставлением полученных данных с результатами анализа пролиферативной активности клеток. Установлено, что воздействие КС-144 на клетки опухолевой линии К562 в концентрациях 0,125 и 0,25 мг/мл сопровождалось выраженным увеличением доли клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза. В указанных концентрациях данный показатель составлял 95,0 - 97,5%, что свидетельствует о выраженной проапоптогенной активности исследуемого соединения в отношении клеток К562 (рисунок 15). При воздействии КС-144 в концентрации 0,5 мг/мл клетки находились в поздней апоптотической стадии 45%, остальная часть клеток находилась на ранней стадии апоптоза. Таким образом, КС-144 и ПВП-иод обладают выраженным проапоптотическим эффектом по отношению к клеткам опухолевой линии К562, причем данный эффект носит выраженный дозозависимый характер (по мере увеличения концентрации от 0,063 до 0,5 мг/мл число клеток, вступающих в апоптоз возрастало) [193].

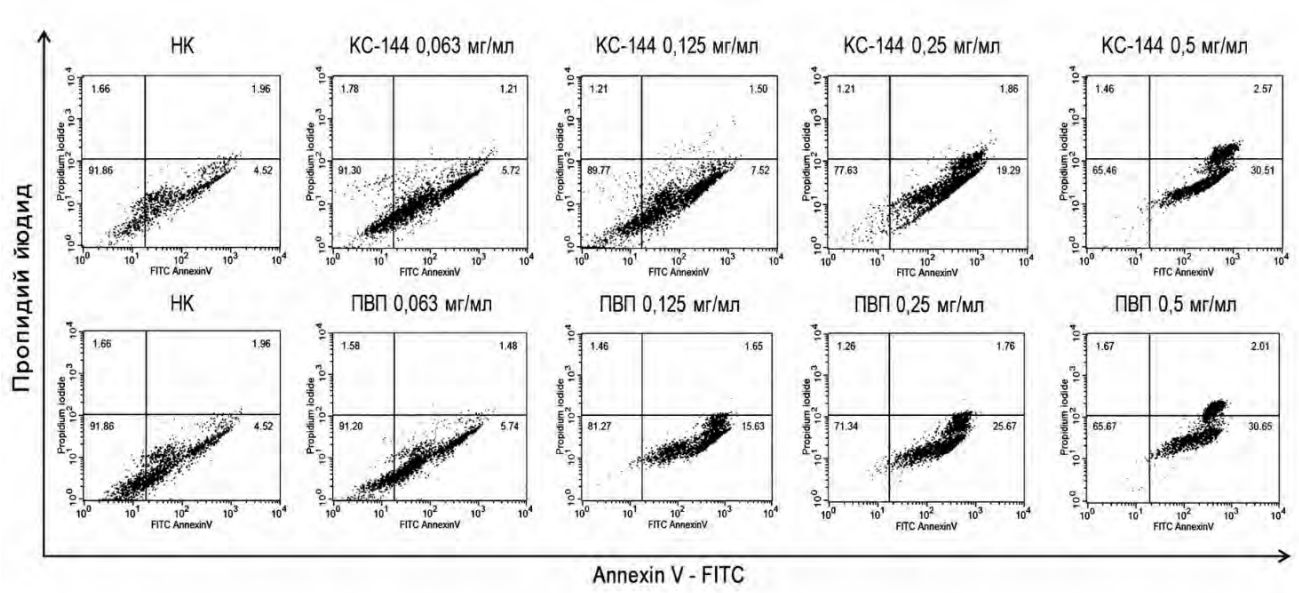


Рисунок 15 – Результаты проапоптогенной активности КС-144 на клетках К562 в методе проточной цитометрии после 48 ч воздействия

Исследование апоптотического потенциала КС-144 на клеточной линии мезотелиомы P31res1.2 проводилось методом двойного окрашивания (Hoechst 33342 / PI) (рисунок 16)

Наблюдается аналогичное апоптотическое действие КС-144 на клеточную линию P31res1.2, в сравнении с клетками К562. Исследования показали, что по мере увеличения концентрации КС-144 от 0,125 до 0,5 мг/мл возрастает и число клеток, вступающих в апоптоз. Установлено, что субстанция КС-144 индуцирует апоптоз клеток, причем данный эффект носит выраженный дозозависимый характер [193].

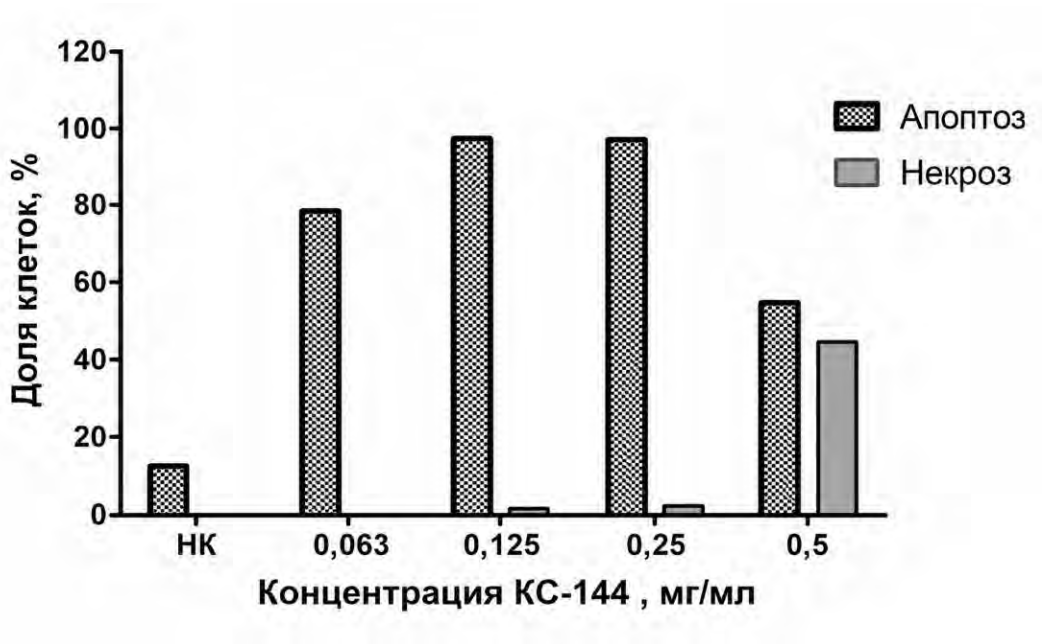


Рисунок 16 – Исследование апоптотического потенциала КС-144 на клетках мезотелиомы P31res1.2 после 48 ч воздействия

Полученные результаты подтверждают, что одним из механизмов фармакологической активности КС-144 является индукция апоптоза. Этот механизм показывает, что в состав исследуемого вещества входит молекулярный иод. Это механизм реализуется при избыточном поступлении иодидов в щитовидную железу, когда иодированию подвергается не только тиреоглобулин, но липиды клеток [246]. Однако, при нормальном функционировании щитовидной железы через путь обратной регуляции, избыточное поступление иодидов в железу блокируется [247]. Кроме того, раковые клетки более чувствительны к молекулярном иода, чем нормальные клетки [248, 249]. Однако, одной из главных проблем при разработке новых противораковых препаратов является возникновение лекарственной устойчивости в опухолевых клетках, что требует оценки вероятности возникновения и отбора устойчивых клеточных клонов.

3.9 Колониеобразование опухолевых линий клеток

Клоногенный анализ представляет собой метод оценки долгосрочной жизнеспособности клеток *in vitro*. Этот метод основан на определении способности отдельных клеток сохранять свой репродуктивный потенциал и образовывать колонии после воздействия исследуемого вещества. В отличие от анализа МТТ, который в основном отражает краткосрочные изменения метаболической активности клеток, клоногенный анализ позволяет оценить последующее восстановление пролиферации клеток. В этом отношении данный метод информативен для характеристики последующих цитостатических и цитотоксических эффектов исследуемого соединения, а также для определения фракции клеток, сохраняющей колониеобразующий потенциал после обработки [250, 251].

Исследование влияния КС-144 на формирование колоний проводили на клетках P31res1.2, цисплатин-чувствительной мезотелиомы P31 и линии рака молочной железы MCF-7 (рисунок 17). Полученные данные анализировали в GraphPad Prism6.

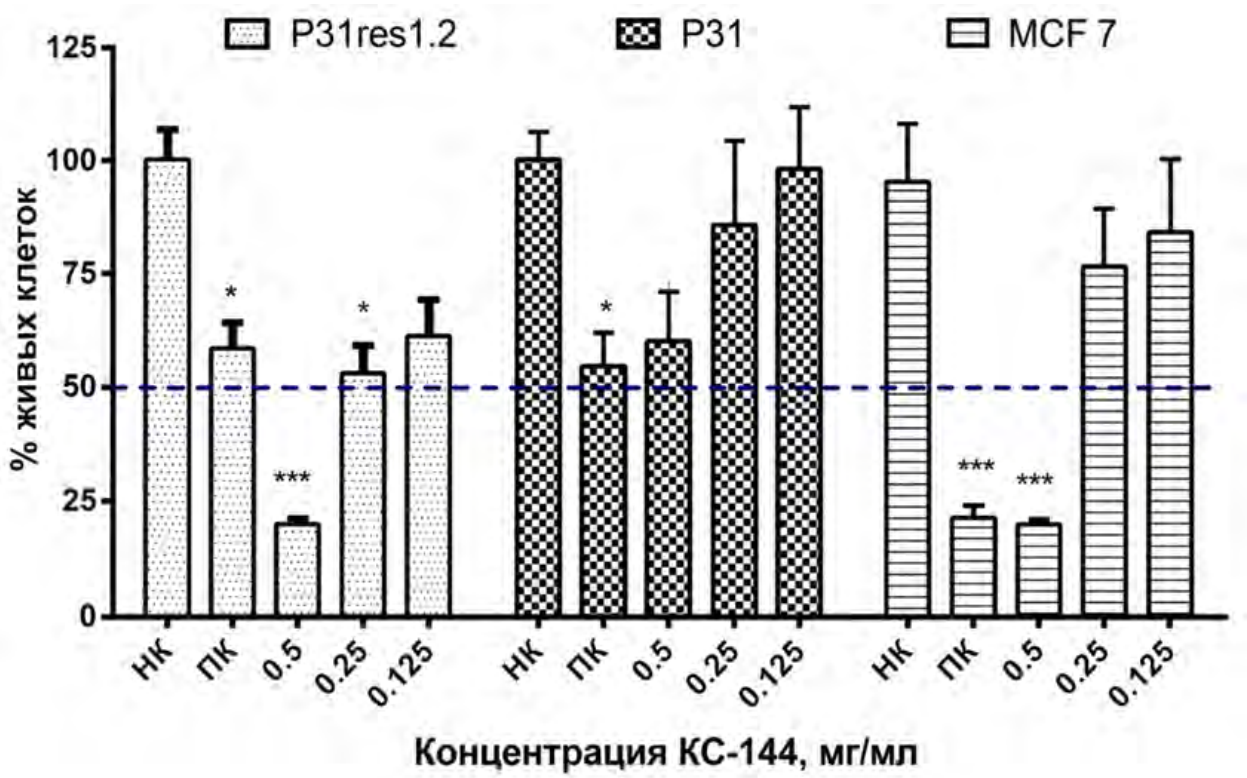


Рисунок 17 – Анализ формирования клеточных колоний P31res1.2, P31 и MCF-7 при воздействии КС-144, (n = 6) (* p <0,05, *** p <0,001)

В результате проведенного исследования было показано, что колониеобразующая способность опухолевых линий клеток мезотелиомы и рака молочной железы значительно снижалась под воздействием всех исследуемых концентраций КС-144. Причем результаты были сопоставимы с контрольным веществом. Наблюдаемое подавление клоногенной выживаемости означает, что даже единичные выжившие клетки теряют способность давать начало новой опухолевой популяции. Таким образом, можно заключить, что КС-144 ингибирует туморогенность раковых клеток *in vitro*, что указывает на глубокий цитотоксический или цитостатический эффект, но и подавляет долгосрочный пролиферативный потенциал опухолевых клеток [193].

Снижение образования колоний в клеточной линии P31res1.2 представляет особый интерес, поскольку эта клеточная модель характеризуется приобретенной устойчивостью к цисплатину. Ранее было показано, что P31res1.2 является устойчивым к цисплатину производным линии злокачественной плевральной мезотелиомы P31 и характеризуется измененной регуляцией апоптотических путей, включая устойчивость к фрагментам каспазы-8 и каспазы-9 [252]. Таким образом, ингибирование образования колоний в клетках P31res1.2 при воздействии КС-144 предполагает, что изучаемое соединение может ингибировать жизнеспособность

опухолевых клеток даже в условиях устойчивости к платине.

С биологической точки зрения, уменьшение числа колоний означает, что часть клеток, оставшихся жизнеспособными после первоначального воздействия агента, утратила способность к дальнейшему клональному росту. Это особенно важно для объяснения противоопухолевого потенциала КС-144, поскольку остаточные клетки, выжившие после терапии, могут служить основой для повторного роста опухолевой популяции, рецидива и развития лекарственно-устойчивого фенотипа. Современные исследования показывают, что устойчивые к лекарствам клетки могут сохраняться после воздействия противоопухолевых препаратов и впоследствии способствовать развитию стойкой резистентности. Поэтому подавление их клоногенного потенциала считается важным показателем при оценке эффективности экспериментальных противоопухолевых соединений [253]. Полученные данные дополняют результаты МТТ теста и подтверждают перспективность дальнейшего изучения КС-144 как соединения, способного не только снижать жизнеспособность опухолевых клеток, но и подавлять их долгосрочный пролиферативный потенциал.

3.10 Клеточный цикл опухолевых линий клеток

Анализ клеточного цикла под воздействием КС-144 показал наибольшую эффективность в отношении цисплатин-резистентной линии мезотелиомы P31res1.2. Поэтому, следующим этапом стало изучение действия КС-144 на распределение клеточного цикла клеток P31res1.2, методом проточной цитометрии. Клетки предварительно инкубировали в течение 48 ч в питательной среде, содержащей концентрации КС-144 в диапазоне от 0,125 до 0,5 мг/мл, для цисплатина (в качестве положительного контроля) - 1,5 мкг/мл. Клетки без обработки использовали в качестве отрицательного контроля [193]. Злокачественные клетки обладают всеми необходимыми молекулярными механизмами для предотвращения остановки клеточного цикла. Активация протоонкогенов приводит либо к развитию факторов роста клеточного деления, либо к биосинтезу рецепторов фактора роста и сигнальных белков, которые не требуют внешней активации и рефрактерности раковых клеток к подавлению сигналов белка. Все это может привести к неограниченному злокачественному росту. Однако при определенных условиях клеточный цикл опухолевых клеток может быть остановлен. Это предотвращает дальнейший рост опухоли и может даже полностью ее уничтожить. Остановка клеточного цикла раковой клетки происходит из-за повреждения структуры ДНК и РНК, что делает невозможным переход к следующей фазе. Молекулярный иод (I_2) может вызывать остановку клеточного цикла в фазах G_1 или G_2/M в нормальных клетках, клетках рака молочной железы и в клетках щитовидной железы [78]. При анализе содержания ДНК было показано, что воздействие лекарственной субстанции КС-144 в исследуемых концентрациях на клеточную линию P31res1.2 привело к значительному увеличению популяции клеток в фазе G_0/G_1, тогда как доля клеток в фазе S и G_2/M снижалась, как показано на рисунке 18, что может быть обусловлено запуском апоптотического пути клеточной гибели.

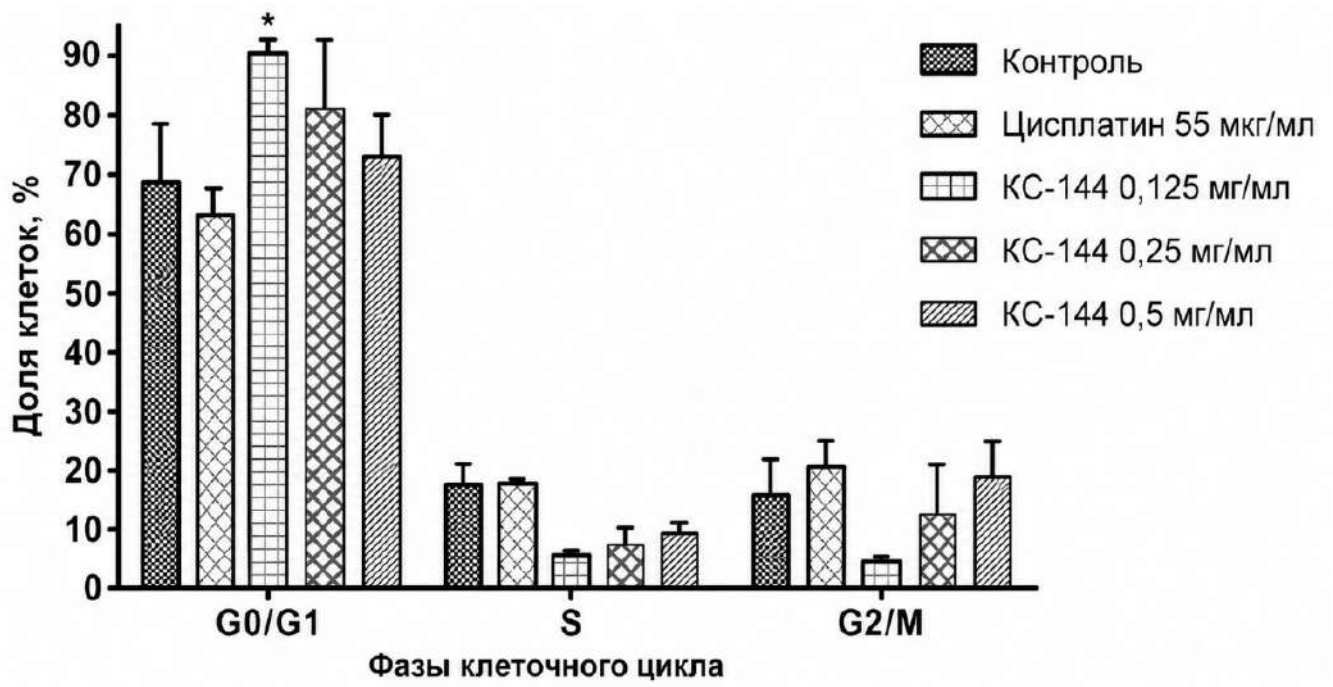
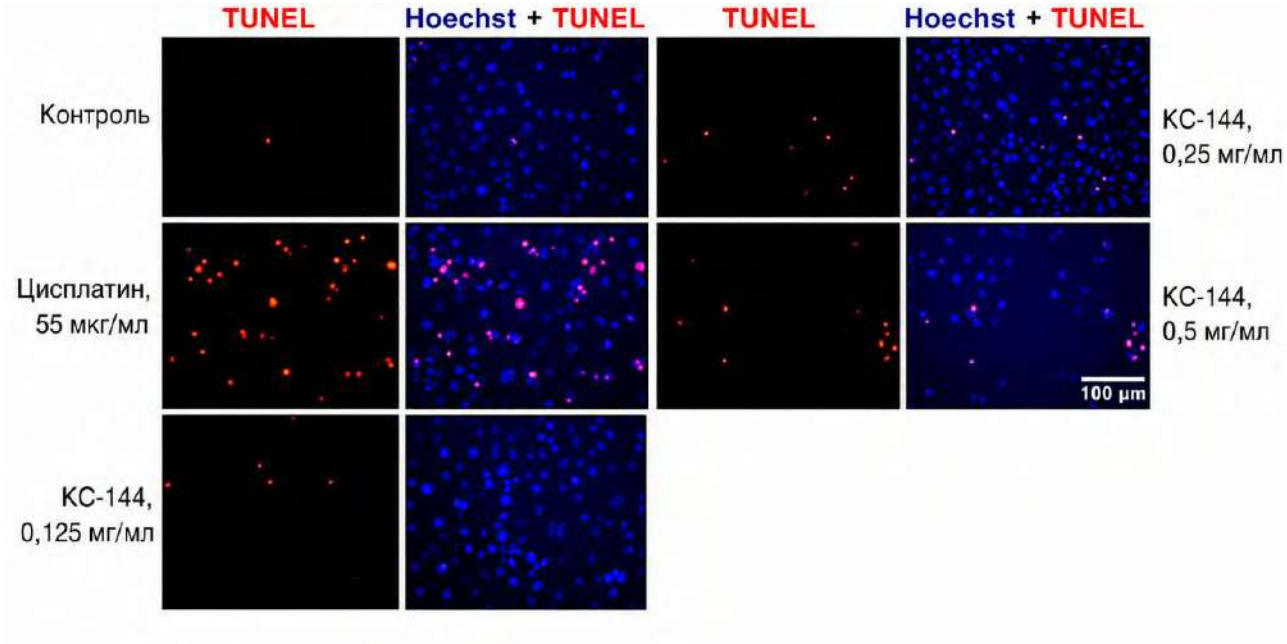


Рисунок 18 – Анализ клеточного цикла в клетках P31res1.2, n = 6
(*p<0,05 по сравнению с негативным контролем)

Остановка клеточного цикла раковых клеток в фазе G_0/G_1 может происходить в результате инактивации Akt пути и снижения уровня cyclinD1 и CDK4. Путь Akt регулирует пролиферацию клеток и прогрессирование клеточного цикла под влиянием белка p27, который, в свою очередь, ингибирует активацию циклических комплексов D-CDK4. Это приводит к остановке клеточного цикла в фазах G_0/G_1 и G_2/M [78]. В соответствии с полученными данными, мы можем предположить, что происходит увеличение экспрессии белка p27, регулирующего течение клеточного цикла.

3.11 Фрагментация ДНК в опухолевых клетках методом TUNEL

Проведен анализ фрагментации ДНК в клеточной линии мезотелиомы P31 методом TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick-end Labelling), который основан на включении флуоресцентной метки в места разрывов ДНК и последующей ее детекции при помощи флуоресцентного микроскопа. Процесс деградации (фрагментации) ДНК рассматривают как один из отличительных признаков апоптоза. Соотношение между Hoechst-позитивными и TUNEL-позитивными ядрами подсчитывали для расчета процента апоптотических клеток, как видно на рисунке 19.



Ядра с поврежденной ДНК – красная область спектра.
Ядра с неповрежденной ДНК (окрашены Hoechst 33342) – синяя флуоресценция.

Рисунок 19 – Анализ фрагментации ДНК в клеточной линии мезотелиомы P31 после 48 чого воздействия КС-144 методом TUNEL; ядра с поврежденной ДНК флуоресцируют в красной области спектра; ядра с неповрежденной ДНК (окрашены Hoechst 33342) – синяя флуоресценция;
масштабная линейка 100 мкм

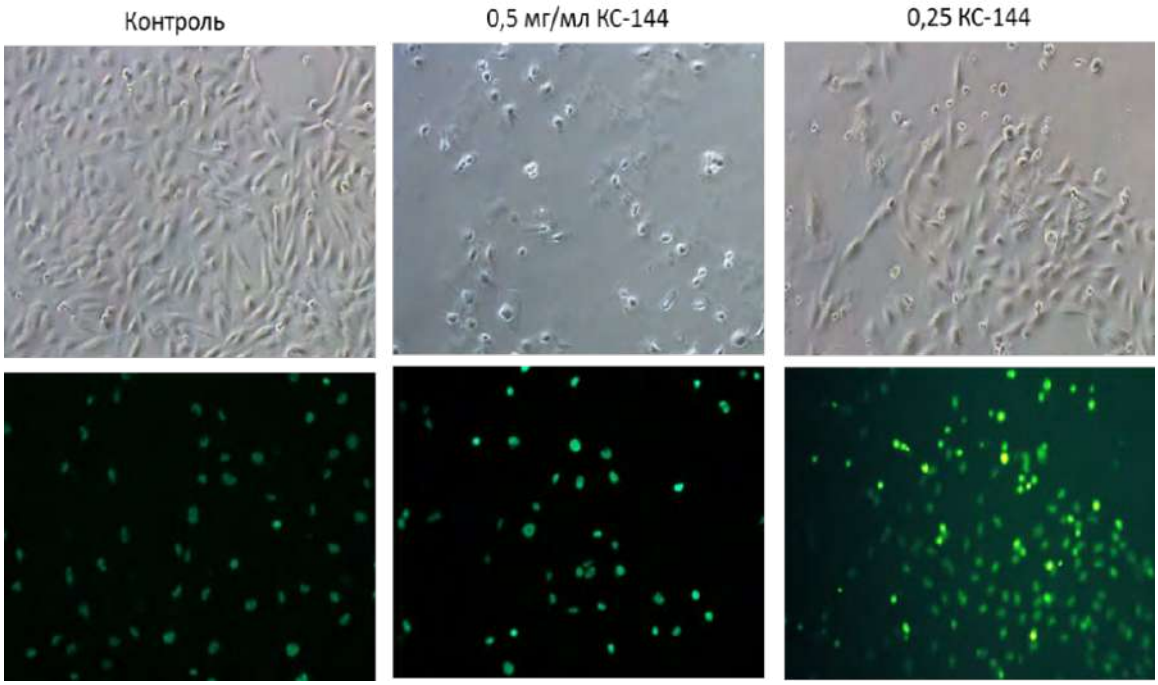
В результате проведенного исследования было показано, что КС-144 в концентрации 0,5 мг/мл индуцирует фрагментацию ДНК опухолевой линии клеток P31, что свидетельствует об индукции программируемой клеточной смерти [193].

В целом, в результате проведенных исследований выявлено, что КС-144 демонстрирует антипролиферативную и цитотоксическую активность в отношении клеток мезотелиомы. Также показано, что КС-144 индуцирует клеточный апоптоз с увеличением числа клеток в фазе G_0/G_1 клеточного цикла. Как показало исследование, подобное действие обусловлено запуском апоптотического пути клеточной гибели, согласно данным литературы [78]. Подобный механизм действия молекулярного иода, входящего в состав КС-144, основан на запуске каспаз-независимого и митохондриально-опосредованного апоптоза.

3.12 Мембранный потенциал митохондрий раковых клеток

Исследования по изучению митохондриальной дисфункции в механизме действия КС-144, потенциал митохондриальной мембраны в опухолевых клетках P31res1.2 оценивали с помощью флуоресцентного красителя родамина 123 (Rh123). Rh123 является потенциал-зависимым катионным красителем, который накапливается преимущественно в функционально активных митохондриях, поэтому изменение интенсивности его флуоресценции отражает нарушение митохондриального мембранного потенциала и функционального состояния митохондрий [254].

После обработки клеток P31res1.2 0,25 мг/мл КС-144 наблюдалось изменение интенсивности флуоресцентного сигнала Rh123 по сравнению с контрольной группой. Это указывает на изменение митохондриального мембранного потенциала и функционального состояния митохондрий на ранней стадии клеточной реакции на исследуемое соединение (рисунок 20).



Увеличение: ×100.

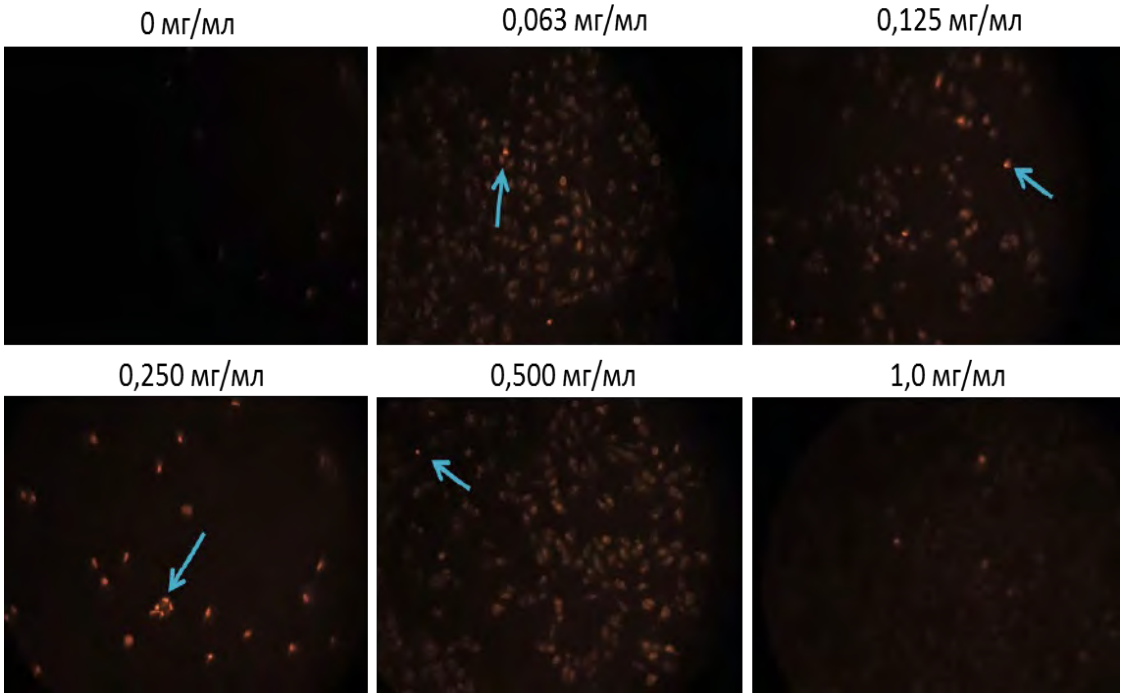
Рисунок 20 – Мембранный потенциал митохондрий клеточной линии P31res1.2 под воздействием КС-144

Флуоресцентное свечение также наблюдается при концентрации 0,5 мг/мл, но на уровне контрольного образца, что свидетельствует о нарушении клеточной целостности. Кроме того, под микроскопом наблюдалось большее количество клеток с морфологическими признаками клеточной смерти по сравнению с контрольным образцом и образцом, обработанным 0,25 мг/мл КС-144. Этот результат может указывать на переход клеток от раннего митохондриального стресса к выраженному митохондриальному повреждению и снижение жизнеспособной клеточной фракции. Потеря митохондриального мембранного потенциала считается одним из основных признаков активации внутреннего, митохондриально-опосредованного пути апоптоза; этот процесс сопровождается нарушением проницаемости митохондриальных мембран и последующей активацией каскада клеточной смерти [255, 256].

Полученные результаты указывают на то, что соединение КС-144 влияет на функциональное состояние митохондрий в клетках P31res1.2. Изменение в передаче сигналов Rh123 после воздействия исследуемого соединения подтверждает участие митохондриальной дисфункции в раннем клеточном ответе и согласуется с ранее полученными данными о проапоптогенной активности соединения КС-144.

3.13 Оценка продукции митохондриального супероксида

Исследования митохондриального окислительного стресса в клетках P31res1.2 после воздействия КС-144 был проведен анализ продукции митохондриального супероксида АФК с использованием флуоресцентного красителя MitoSOX Red. На рисунке 21 показано, что после воздействия 0,25 мг/мл КС-144 в клетках P31res1.2 наблюдалось в диапозоне красной флуоресценции по сравнению с контролем, что указывает на повышенное образование митохондриального супероксида. Этот эффект согласуется с представлением о том, что митохондрии являются одним из основных источников активных форм кислорода в опухолевых клетках, а увеличение митохондриальной сигнализации АФК может быть связано с нарушением дыхательной цепи, повреждением митохондриальных мембран и активацией апоптотических процессов [257, 258].



Стрелками обозначена внутриклеточную продукцию супероксида.

Рисунок 21 – Продукция митохондриального супероксида клеточной линией P31res1.2 с красителем MitoSOX Red

При более высоких концентрациях КС-144 0,5 – 1,0 мг/мл сигнал MitoSOX Red снижался почти до фонового уровня. Данный результат нельзя интерпретировать как отсутствие окислительного стресса. Более вероятно, что при высоких концентрациях КС-144 происходит выраженное повреждение клеток и митохондрий, которое сопровождается потерей митохондриального мембранного потенциала, нарушением накопления потенциалзависимых красителей и уменьшением числа жизнеспособных клеток, способных удерживать флуоресцентный зонд. Это особенно важно при интерпретации результатов MitoSOX Red, поскольку этот краситель чувствителен к

поляризации митохондрий, и при деполяризации митохондрий он может перераспределяться за пределы митохондрий, поэтому общий флуоресцентный сигнал следует оценивать как полуколичественный показатель [257, 258].

Полученные данные позволяют характерирозовать дозозависимый эффект КС-144 на митохондрии клеток P31res1.2. При концентрации 0,25 мг/мл КС-144, вызывает митохондриальный стресс, сопровождающийся изменениями $\Delta\Psi m$ и увеличением продукции митохондриального супероксида. При концентрациях 0,5 - 1,0 мг/мл наблюдается более выраженное повреждение клеток, при котором митохондрии теряют способность удерживать потенциалзависимые красители, флуоресцентный сигнал снижается, и появляются морфологические признаки гибели клеток. Таким образом, концентрация 0,25 мг/мл может считаться более информативной для изучения ранних митохондриальных механизмов действия КС-144, в то время как более высокие концентрации демонстрируют выраженный цитотоксический эффект.

Эти результаты согласуются с работой Wang и соавт., в которой было показано, что острое воздействие высоких концентраций иодида может индуцировать образование АФК в присутствии ингибиторов митохондриальной дыхательной цепи, а супероксиддисмутаза рассматривается как защитный фактор против окислительного повреждения, вызванного иодидом. Это подтверждает, что соединения иода могут влиять на митохондриальный окислительно-восстановительный баланс и участвовать в формировании АФК-зависимых клеточного ответа [259].

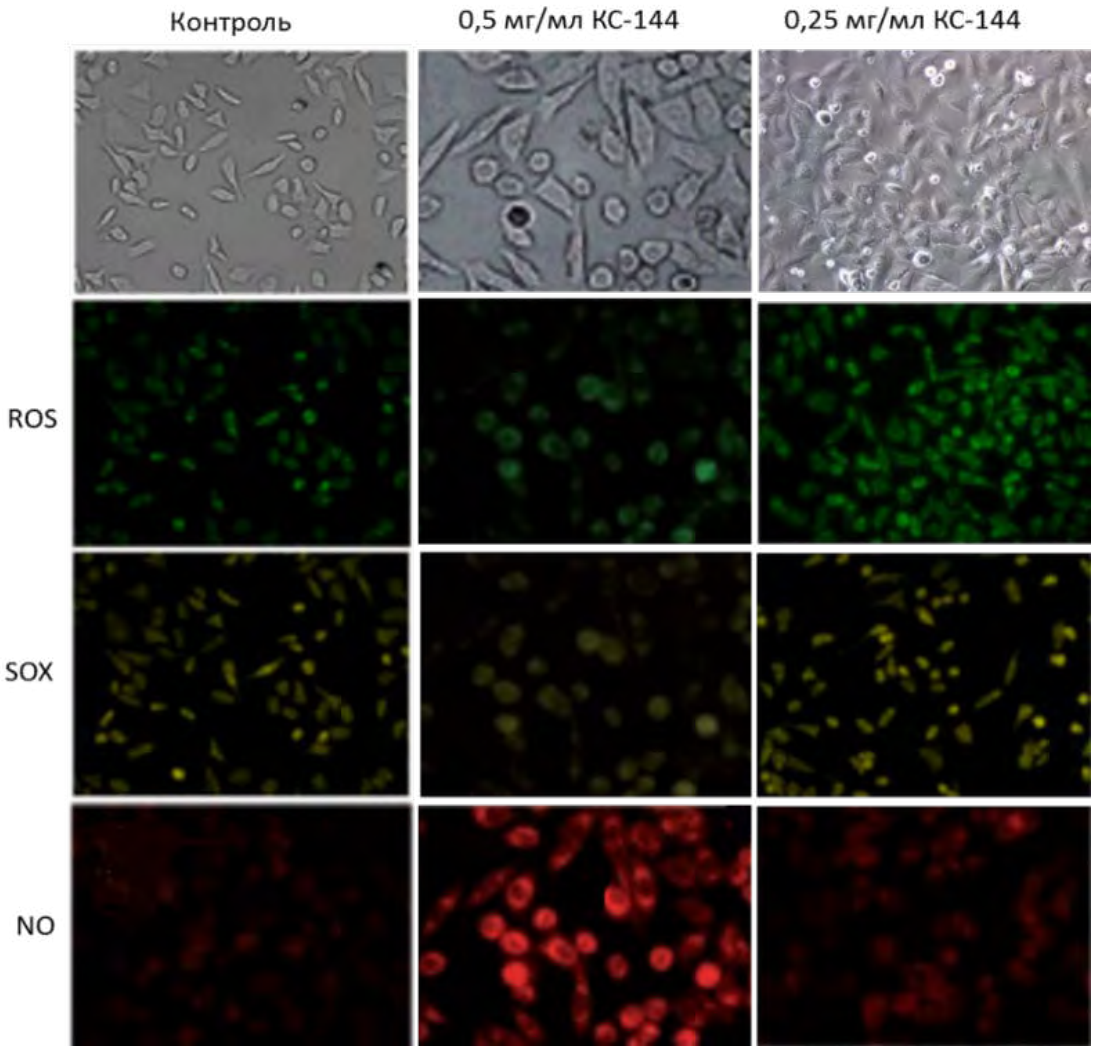
Полученные результаты также согласуются с ранее описанными противоопухолевыми механизмами молекулярного иода. Исследование Shrivastava и соавт. показало, что молекулярный иод индуцирует апоптоз в клетках рака молочной железы MCF-7 через митохондриально-опосредованный путь, сопровождаясь снижением митохондриального мембранного потенциала, изменениями соотношения Bax/Bcl-2 и высвобождением апоптогенных факторов из митохондрий [78]. Это позволяет предположить, что КС-144, как иодсодержащее соединение, может оказывать свое противоопухолевое действие не только посредством прямого цитотоксического повреждения, но и посредством нарушения функции митохондрий, изменения окислительно-восстановительного гомеостаза и активации апоптотических механизмов.

Таким образом, КС-144 в концентрации 0,25 мг/мл вызывает изменение митохондриального мембранного потенциала и повышение продукции митохондриального супероксида в клетках P31res1.2, что указывает на вовлечение митохондрий и АФК-зависимых механизмов в ранний клеточный ответ на воздействие исследуемого соединения.

3.14 Окислительная система раковых клеток

Проведены исследования по изучению окислительной системы на культуре клеток мезотелиомы P31res1.2 под воздействием КС-144. После воздействия КС-144 в концентрации 0,5 мг/мл отмечалось повышение NO-ассоциированного флуоресцентного сигнала по сравнению с концентрацией 0,25 мг/мл (рисунок

22). Напротив, экспрессия SOD-ассоциированный сигнал при 0,25 мг/мл КС-144 максимальна, чем при 0,5 мг/мл.



Увеличение: ×100.

Рисунок 22 – Окислительно-восстановительная система клеток мезотелиомы P31res1.2 после воздействия КС-144

Наблюдаемая экспрессия NO воспроизводится на ранних стадиях окислительного процесса, далее экспрессия снижается за счет того, что вступают процессы включения супероксида, который трансформируется SOD до перекиси водорода. Увеличение продукции АФК можно связать с тем, что этот маркер индуцирует активацию ASK1/JNK, что в свою очередь, запускает клеточный апоптоз и/или аутофагию.

Всецело, противораковый потенциал КС-144, нового координированного соединения иода и лития, в отношении устойчивых к цисплатину линий клеток плевральной мезотелиомы. Используя множество дополнительных анализов, включая цитотоксичность, клоногенную выживаемость, заживление ран, митохондриальный мембранный потенциал, количественную оценку ROS/RNS и анализ клеточного цикла демонстрируют, что КС-144 эффективно подавляет

пролиферацию клеток мезотелиомы, вызывает окислительный стресс и митохондриальную дисфункцию, а также запускает остановку клеточного цикла в фазе G_0/G_1 и апоптоз. Эти механистические данные указывают на КС-144 как на перспективного кандидата для местного или интраоперационного применения с целью уничтожения остаточных клеток мезотелиомы и улучшения послеоперационных результатов при рефрактерном заболевании.

3.15 Экспрессия белковых маркеров методом вестерн-блоттинг

Экспрессию белковых маркеров, участвующих в апоптозе и регуляции клеточного цикла, в клеточной линии P31res1.2 после 48 часов воздействия КС-144 и/или цисплатина изучали методом вестерн-блоттинга. Для анализа были выбраны маркеры цитохром С, p21, циклина D1 и CDK4, поскольку эти белки участвуют в основных механизмах митохондриально-опосредованной клеточной смерти и переходе клеток в фазу G_1/S. Цитохром С является одним из ключевых белков митохондрий-опосредованного пути апоптоза, поскольку его высвобождение из митохондрий в цитозоль связано с запуском каспазного каскада и развитием программируемой клеточной гибели. Белок p21 относится к ингибиторам циклин-зависимых киназ и участвует в регуляции остановки клеточного цикла, преимущественно на уровне перехода G_1/S. Циклин D1 и CDK4 являются важными регуляторами прохождения клеток через G_1-фазу и подготовки к переходу в S-фазу, поэтому изменение их экспрессии может отвечать механизму, которое приводит к нарушению пролиферативной активности опухолевых клеток.

Согласно результатам, SDS-PAGE и последующего вестерн-блоттинга, экспрессия белков цитохром С, p21, циклина D1 и CDK4 была обнаружена во всех исследованных образцах, т.е. в контрольных клетках, клетках, обработанных КС-144, клетках, обработанных цисплатином, и их комбинации. Наличие исследованных белков во всех группах указывает о сохранении базальной экспрессии маркеров, связанных с митохондриальным статусом и регуляцией клеточного цикла, сохраняется в клеточной линии P31res1.2. Кроме того, визуальный иммуноблот-анализ не выявил каких-либо очевидных различий между экспериментальными и контрольными образцами, что может указывать на то, что уровни этих белков существенно не изменились после 48 ч воздействия КС-144 в выбранных экспериментальных условиях (рисунок 23).

Это может указывать на то, что в выбранных экспериментальных условиях не наблюдалось существенных изменений в уровнях экспрессии исследуемых белков после 48 ч воздействия КС-144, цисплатина и их комбинаций, или что обнаруженные изменения носили умеренный характер и требуют дальнейшей количественной оценки с помощью денситометрического анализа.

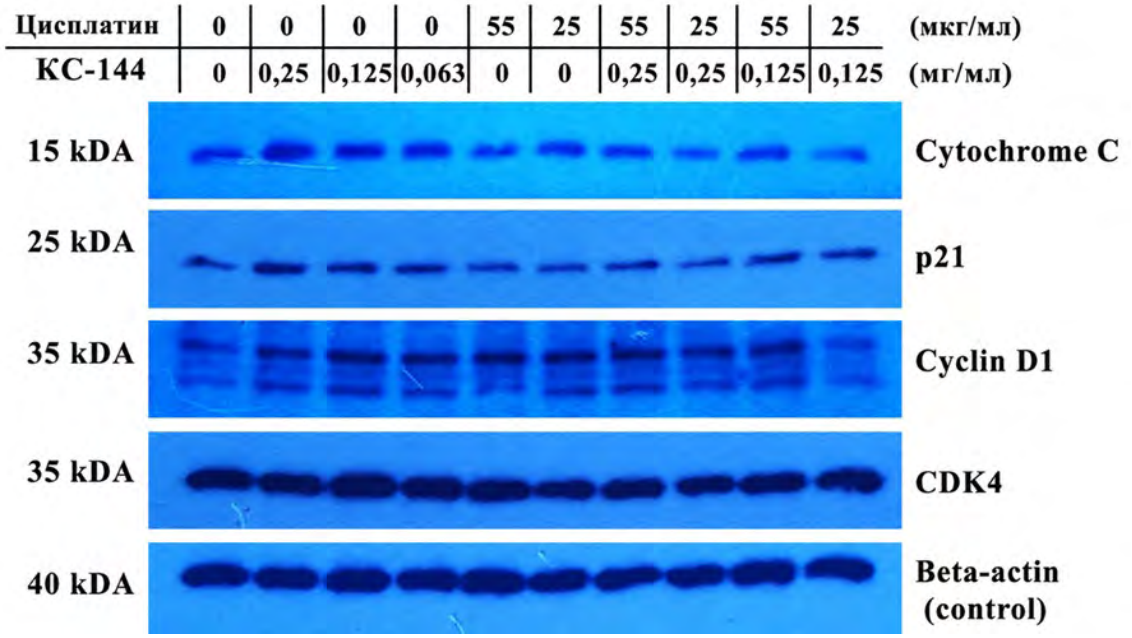


Рисунок 23 – Вестерн-блоттинг клеточной линии P31res1.2, экспрессирующих цитохром С, p 21, Cyclin D1, и CDK4 после 48ч воздействия КС-144 и/или цисплатина.

По результатам электрофореза и вестер-блотинга наблюдается экспрессия белковых маркеров (цитохром С, p 21, Cyclin D1, и CDK4) во всех исследуемых образцах, т.е. в контрольных клетках, в клетках, обработанных КС-144, в клетках, обработанных цисплатином, и в группах, в которых использовалась их комбинация. В то же время отсутствие значительных изменений в этих маркерах не исключает биологического эффекта КС-144.

Полученные данные свидетельствуют о том, что координационное соединение КС-144 воздействует на опухолевые линии не напрямую, а опосредовано. Иод попадая в организм не может напрямую в молекулярном виде достичь опухоли. Молекулярный иод быстро взаимодействует с белками, органическими кислотами и ароматическими соединениями окисляя их [260].

Цитохром С указывает на участие митохондриального пути апоптоза, но с функциональной точки зрения важны не только его общий уровень, но и его перераспределение из митохондрий в цитозоль, а также последующая активация каспаз и расщепление белка PARP. p21, циклин D1 и CDK4 являются регуляторами клеточного цикла, но их роль зависит от клеточного контекста, статуса p53, внутриклеточной локализации и активности соответствующих белковых комплексов. В частности, p21 может выполнять как опухолеподавляющие, так и антиапоптотические функции, а ось циклин D1–CDK4/6 остается важной терапевтической мишенью при опухолях мезотелиального происхождения [74, 261, 262].

Учитывая природу соединения иода КС-144, можно предположить, что его противоопухолевый эффект в основном опосредован косвенно через модуляцию окислительно-восстановительного баланса, нарушение митохондриального

гомеостаза и образование биологически активных производных иода. Маловероятно, что этот эффект напрямую и быстро связан с изменениями общего уровня белков цитохрома С, p21, циклина D1 и CDK4. Это согласуется с данными литературы, согласно которым молекулярный иод может оказывать внетиреоидное антипролиферативное действие, взаимодействовать с клеточными окислительно-восстановительными системами и индуцировать механизмы митохондриальной гибели клеток в опухолевых клетках [74, 78, 79].

3.16 Мутагенная активность на клетках L5178Y ТК$^{+/-}$ clone (3.7.2С)

Одним из ключевых показателей токсичности и безопасности любого лекарственного вещества является потенциальная способность вызывать мутации и повреждения генетического аппарата клетки. Первичную оценку генотоксичность проводят в батарее тестов *in vitro* и *in vivo* [263, 264]. Анализ проводится с 4 -часовой экспозицией с метаболической активацией микросомальной фракцией печени крыс S9 и без метаболической активации фракцией S9.

На предварительном этапе была оценена цитотоксичность КС-144 в отношении клеток мышиной лимфомы L5178Y ТК$^{+/-}$ clone 3.7.2С. Показано, что при концентрациях от 0,5 до 5,0 мг/мл исследуемое соединение вызывало снижение жизнеспособности клеток на уровне 50±5% как при наличии S9-фракции, так и без метаболической активации. Результаты предварительного анализа представлены в таблице 14.

На основании этих данных для дальнейшей оценки мутагенной активности были выбраны концентрации КС-144, не оказывающие выраженного цитотоксического действия. Такой подход соответствует принципу выбора дозы для тестирования генотоксичности *in vitro*, который гласит, что диапазон тестируемых концентраций должен охватывать максимально допустимые уровни воздействия, не вызывающие чрезмерного снижения жизнеспособности клеток, что могло бы затруднить интерпретацию мутагенного эффекта.

Таблица 14 – Анализа цитотоксичности КС-144 в клетках L5178Y ТК$^{+/-}$

Метаболическая активация	**Воздействие**	**Концентрация (мг/мл)**	**Mean FCC**	**% RICC**	**% Tox**
S9 mix (-)	НК	0	289971	-	-
	Митомицин С (ПК)	0,0001	169983	58,62	41,38
	КС-144	5,000	29997	10,34	89,66
		2,500	49995	17,24	82,76
		1,250	69993	24,14	75,86
		0,750	98606	34,01	65,99
		0,500	139986	48,28	51,72
		0,250	149985	51,72	Не токсичн.
		0,125	179982	62,07	Не токсичн.
		0,063	219978	75,86	Не токсичн.
		0,032	279972	96,55	Не токсичн.
		0,016	329967	113,79	Не токсичн.

Продолжение таблицы 14

S9 mix (+)	НК	0	179982	-	-
	Циклофосфамид (ПК)	0,010	129987	72,22	27,78
	КС-144	5,000	59994	33,33	66,67
		2,500	69993	38,89	61,11
		1,250	79992	44,44	55,56
		0,750	87990	48,89	51,11
		0,500	81906	45,51	54,49
		0,250	109989	61,11	Не токсичн.
		0,125	139986	77,78	Не токсичн.
		0,063	149985	83,33	Не токсичн.
		0,032	169983	94,44	Не токсичн.
		0,016	159984	88,89	Не токсичн.

Относительное увеличение количества клеток после обработки КС-144 оценивали по показателю RICC (% Relative Increase in Cell Counts). Этот индекс использовали для характеристики цитотоксического эффекта исследуемого соединения на клетки мышиной лимфомы L5178Y $TK^{+/-}$ клона 3.7.2C по сравнению с отрицательным контролем. Цитотоксичность КС-144 оценивали в диапазоне концентраций от 0,016 до 5,0 мг/мл в условиях 4-часовой экспозиции как в присутствии метаболической активации с использованием микросомальной фракции печени крыс S9, так и без метаболической активации. Положительные контроли (без смеси метаболических активаторов S9): митомицин С 0,1 мкг/мл и положительные контроли (со смесью метаболических активаторов S9): циклофосфамид 10,0 мкг/мл.

Предварительная оценка цитотоксичности показала, что КС-144 вызывал значительное снижение относительного роста клеток при концентрациях от 0,5 до 5,0 мг/мл вызывал выраженное снижение относительного прироста клеток, что свидетельствует о цитотоксическом действии соединения в данном диапазоне концентраций. На основании этих данных были выбраны концентрации КС-144, не вызывающие значительных цитотоксических эффектов, для дальнейшего тестирования микроядер. Начальная концентрация для анализа составила 0,250 мг/мл, что соответствовало верхнему пределу нецитотоксического диапазона и позволило точно оценить потенциальные генотоксические эффекты исследуемого соединения без искажения результатов значительной гибелью клеток.

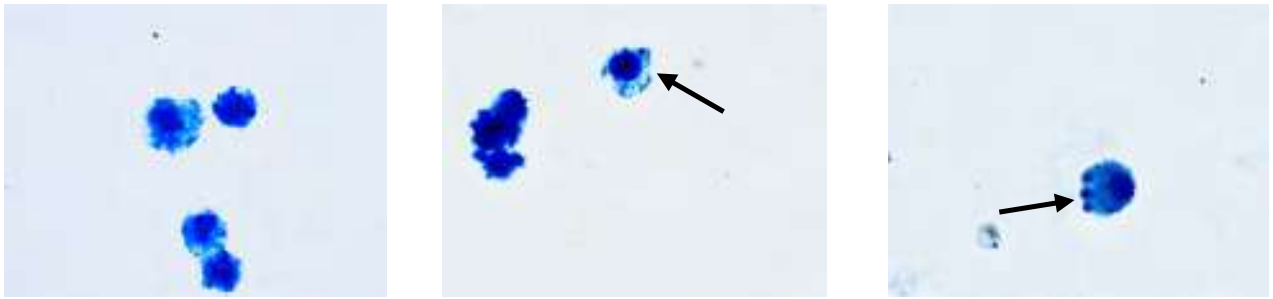
Учитывая прямое цитотоксическое действие КС-144 на клетки, начальной концентрацией стала 0,250 мг/мл, которая соответствовала усредненному значению $ЦТК_{50}$. Образование микроядер (МН) оценивали, как индикатор хромосомных повреждений, а частоту микроядер определяли в 1000 клетках на каждую группу лечения. Результаты представлены в таблице 15 в виде средней частоты микроядер на 1000 клеток ± стандартное отклонение (SD).

Таблица 15 – Частота микроядер в клетках мышиной лимфомы L5178Y $TK^{+/-}$ при различных концентрациях КС-144

Метаболическая активация	**Воздействие**	**Концентрация, мг/мл**	**МН (Mean ± SD)**	**Точный критерий Фишера, p**	****Two-way ANOVA**
S9 mix (-)	НК	0	3,0±0,0	-	-
	Митомицин С (ПК)	0,0001	12,5±0,7*	0,035	<0,0001
	КС-144	0,016	2,5±0,7	1,000	>0,05
		0,032	4,0±1,4	1,000	>0,05
		0,063	4,5±2,1	1,000	>0,05
		0,125	3,5±0,7	1,000	>0,05
		0,250	2,5±0,6	1,000	>0,05
S9 mix (+)	НК	0	5,5±0,7	-	-
	Циклофосфомид (ПК)	0,010	15,0±1,4*	0,040	<0,0001
	КС-144	0,016	2,0±0,0	0,452	<0,01
		0,032	4,5±0,5	0,753	>0,05
		0,063	7,0±1,4	0,774	>0,05
		0,125	6,5±0,7	0,774	>0,05
		0,250	7,5±2,1	0,580	>0,05

Примечания:
1- *Значимость для p<0,05;
2- **Two-way ANOVA (по отношению негативного контроля) - множественное сравнение критерием Даннета; n=3.

Микроядра (МН) определялись как небольшие круглые ядра, четко отделенные от основного ядра клетки (рисунок 24).



A B C

Рисунок 24 – Микроскопическое изображение клеточных микроядер (стрелки) в контрольных образцах клеток L5178Y, окрашенных 3% раствором Гимзы: А-отрицательный контроль, В-митомицин С, С-циклофосфамид; увеличение ×100

Воздействие КС-144 на клетки мышиной лимфомы L5178Y $TK^{+/-}$ в диапазоне концентрации 0,016 - 0,25 мг/мл не выявило мутагенного эффекта ни с метаболической активацией микросомальной фракцией S9. Однако, в

присутсвии системы метаболической активации S9 при минимальной концентрации КС-144 (0,016 мг/мл) по результатам дисперсионного анализа было выявлено статистическое различие (<0,01), которое объяснется напротив низкой частотой образования микроядер в сравнении с негативным контролем. Это различие было обусловлено снижением средней частоты микроядер до 2,0±0,0 по сравнению с 5,5±0,7 в группе отрицательного контроля. Следовательно, наблюдаемое изменение не указывает на генотоксический эффект соединения КС-144 и не демонстрирует признаков биологически значимой дозозависимой реакции.

Известно, что комплексы иода с поливинилпирролидоном не проявляют генотоксичности *in vitro* [265]. Однако имеются данные об образовании генотоксичных побочных продуктов дезинфекции в присутствии иодидов, бромидов, органических веществ и сильного окислителя, такого как хлор [266]. Увеличение мутагенного потенциала также наблюдалось при комбинированном воздействии иода и перекиси водорода на дрожжи [142, 267]. Таким образом, сам иод не обладает генотоксическим действием, но его сочетание с более сильным окислителем может усиливать активность последнего. Более того, мутагенный эффект может быть связан не только с прямым повреждением ДНК [220]. Он может возникать из-за эпигенетических эффектов на регуляцию клеточного цикла. Например, показано, что воздействие LiCl в высоких концентрациях приводит к снижению экспрессии CDKN1C и уровня кодируемого им белка p57Kip2 и сопровождается признаками повреждения ДНК [268]. Хотя в стандартном наборе генотоксических тестов оротат лития не показал мутагенного эффекта [269].

В этом исследовании на клетках L5178Y $TK^{+/-}$ clone (3.7.2C) воздействие КС-144, содержащего галогениды лития, не увеличило частоту образования микроядер, что свидетельствует об отсутствии генотоксичности.

В данном исследовании действие соединения КС-144 на клетки мышиной лимфомы L5178Y $TK^{+/-}$ клона 3.7.2C не сопровождалось увеличением частоты образования микроядер по сравнению с отрицательным контролем. Этот эффект наблюдался как в присутствии, так и в отсутствии системы метаболической активации S9. Полученные данные демонстрируют, что соединение КС-144 не проявляет генотоксического эффекта в условиях проведенного микроядерного теста.

Согласно критериям интерпретации результатов микроядерного теста, положительный ответ регистрируется, если обнаруживается статистически значимое и дозозависимое увеличение частоты микроядер под действием исследуемого вещества по сравнению с отрицательным контролем. Отрицательный ответ регистрируется, если статистически значимого увеличения частоты микроядер по сравнению с отрицательным контролем не наблюдается.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что КС-144 не вызывает образования микроядер в клеточной линии млекопитающих L5178Y $TK^{+/-}$ клон 3.7.2C и не проявляет генотоксического

действия в данных условиях тестирования, как с метаболической активацией S9, так и без нее.

3.17 Генотоксичность КС-144 методом Эймса

Одним из ключевых показателей токсичности любого нового химического соединения является его потенциальная способность вызывать мутации и повреждения генетического аппарата клетки. Первоначальная оценка генотоксичности проводится с использованием ряда тестов *in vitro* и *in vivo* [187]. Бактериальный тест Эймса, быстрый и экономически эффективный метод изучения мутагенного потенциала различных веществ [188]. Токсичность КС-144 тестировали на всех штаммах в концентрациях от 0,03 до 5,0 мг/чашку Петри. Тестируемый образец разбавляли в фосфатно-буферном растворе (ФБС). ФБС использовали в качестве отрицательного контроля. В соответствии с Руководством ОЭСР № 471 в качестве мутагенов использовали следующие положительные контроли: 2,4,7-тринитро-9-флуоренон, азид натрия, метилметансульфонат, а также промутагены: 2-аминоантрацен и бензо(а)пирен [227]. Тестовые штаммы обрабатывали КС-144 в отсутствие и при наличии метаболической активации. На рисунке 25 показаны результаты исследования мутагенности КС-144 в тесте Эймса на штаммах *S. typhimurium* и *E. coli*.

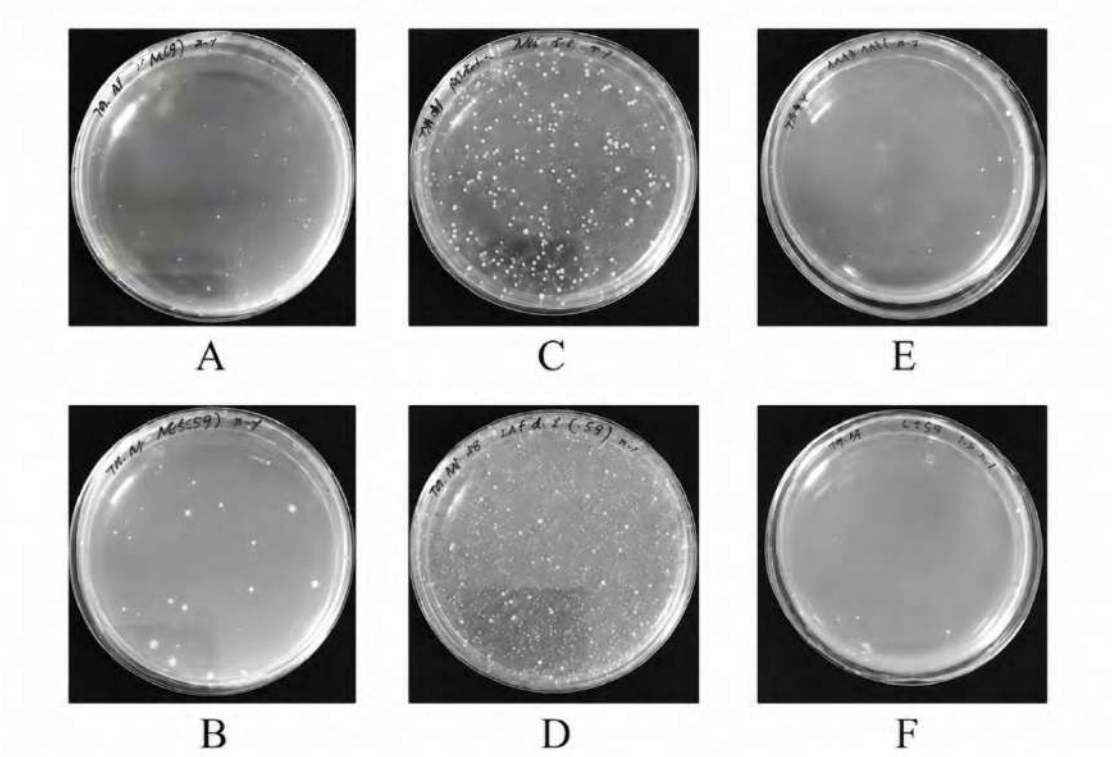


Рисунок 25 – Репрезентативные изображения бактериальных чашек Петри, демонстрирующие результаты теста Эймса, оценивающего воздействие КС-144 на штамм *Salmonella typhimurium* TA98: A-отрицательный контроль с активацией S9, B- отрицательный контроль без активации S9, C-положительный контроль с активацией S9, D- положительный контроль без активации S9, E- 1581 мг/чашка Петри КС-144 с активацией S9 и F- 5,0 мг/чашка Петри КС-144 с активацией S9

Результаты теста Эймса (с экзогенной метаболической активацией и без нее) при концентрациях КС-144 0,03 мг/чашку, 0,08 мг/чашку, 0,25 мг/чашку, 0,79 мг/чашку и 2,5 мг/чашку представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Мутагенная активность КС-144 в тесте обратных мутаций бактерий

	Воздействие	**Концентрация, мкг /чашку**	**Количество колоний-ревертантов на чашку (Mean± SD)**				
			ТА 98	**ТА 100**	***E. coli* WP2**	**ТА1535**	**ТА 1537**
S9 mix (–)	ФБС (НК)	0,0	28,0±2,0	91,7±5,7	31,0±8,0	19,3±1,1	61,7±2,1
	КС-144	2500,0	19,3±7,6	84,7±6,0	16,7±2,5	6,3±4,7	50,0±5,3
		790,0	25,0±6,6	80,7±7,4	29,0±8,0	19,3±6,0	59,0±6,5
		250,0	35,3±1,2	83,3±2,1	43,3±6,0	20,3±7,6	58,0±8,0
		80,0	26,3±2,5	83,7±4,5	46,0±5,3	28,0±2,6	55,0±6,2
		30,0	22,3±4,2	97,7±5,1	36,0±3,0	24,0±6,0	53,0±5,6
	2,4,7-Trinitro-9-fluorenone	0,2	654,3±45,5*	-	-	-	312,7±9,0*
	Sodium azide	3,0	-	249,3±14,6*	-	165,0±7,0*	-
	Methyl methanesulfonate	4000	-	-	306,0±9,8*	-	-
S9 mix (+)	ФБС (НК)	0,0	51,7±1,5	145,7±2,1	74,3±2,5	37,7±3,1	83,3±2,5
	КС-144	2500,0	22,7±4,2	68,0±3,6	30,0±14,0	2,3±1,3	0,7±1,0
		790,0	18,3±8,0	87,3±2,1	55,7±7,5	45,3±5,8	53,3±6,4
		250,0	25,3±1,2	93,3±2,1	53,3±8,1	36,3±6,8	68,0±3,6
		80,0	16,3±2,5	103,7±4,5	52,7±6,4	29,3±6,0	75,0±4,3
		30,0	18,0±2,6	109,3±11,0	59,3±6,5	43,0±13,1	63,0±4,6
	2-Aminoanthracene	5,0	242,0±14,0*	-	-	245,7±7,5*	245,0±9,0*
	2-Aminoanthracene	20,0	-	-	254,7±7,0*	-	-
	Benzo[a]pyrene	5,0	-	281,0±21,7*	-	-	-

Примечание - *, Значимая разница ($p < 0,05$) по сравнению с отрицательным контролем с использованием теста Тьюки или однофакторного дисперсионного анализа.

Как видно из таблицы 16, действие соединения КС-144 в исследованном диапазоне концентраций 30 - 2500 мкг/чашку Петри не приводило к дозозависимому увеличению числа ревертантных колоний ни в одном из использованных тест-штаммов (*S. Typhimurium*: ТА98, ТА100, ТА1535, ТА1537 и *E. coli* WP2). Данный эффект отсутствовал как в условиях экзогенной метаболической активации S9, так и без нее. Число ревертантных колоний в исследуемых концентрациях КС-144, находилось на уровне, сопоставимом или не превышающем значения отрицательного контроля, что свидетельствует об отсутствии мутагенной активности исследуемой субстанции в условиях проведенного теста.

Положительные контроли вызывали выраженное и статистически значимое увеличение числа ревертантных колоний в соответствующих тест-штаммах. Это

подтверждает чувствительность использованных штаммов бактерий, функциональную активность системы метаболической активации S9 и правильность проведения эксперимента. Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что КС-144 не индуцирует обратные мутации у бактерий и не проявляет мутагенного действия в тесте Эймса в исследованном диапазоне концентраций.

Количество ревертантных колоний, сформировавшихся после воздействия КС-144, представлено на рисунках 26 - 30. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (M ± SD) количества ревертантных колоний из двух независимых экспериментов с различными концентрациями КС-144 (30,0, 80,0, 250,0, 790,0 и 2500,0 мкг/чашку Петри) с разными штаммами по сравнению с отрицательным контролем (ФБС). Положительные контроли (без смеси метаболических активаторов S9): 2,4,7-тринитро-9-флуоренон 0,2 мкг/чашку Петри (TA98 и TA1537); азид натрия 3,0 мкг/чашку Петри (TA100 и TA1535); метилметансульфонат 4000 мкг/чашку Петри (*E. coli WP2*). Положительные контроли (с использованием смеси активаторов метаболизма S9): 2-аминоантрацен 5,0 мкг/чашку Петри (TA98, TA1535 и TA1537); 2-аминоантрацен 20,0 мкг/чашку Петри (*E. coli WP2*); бензо(а)пирен 5,0 мкг/чашку Петри (TA100).

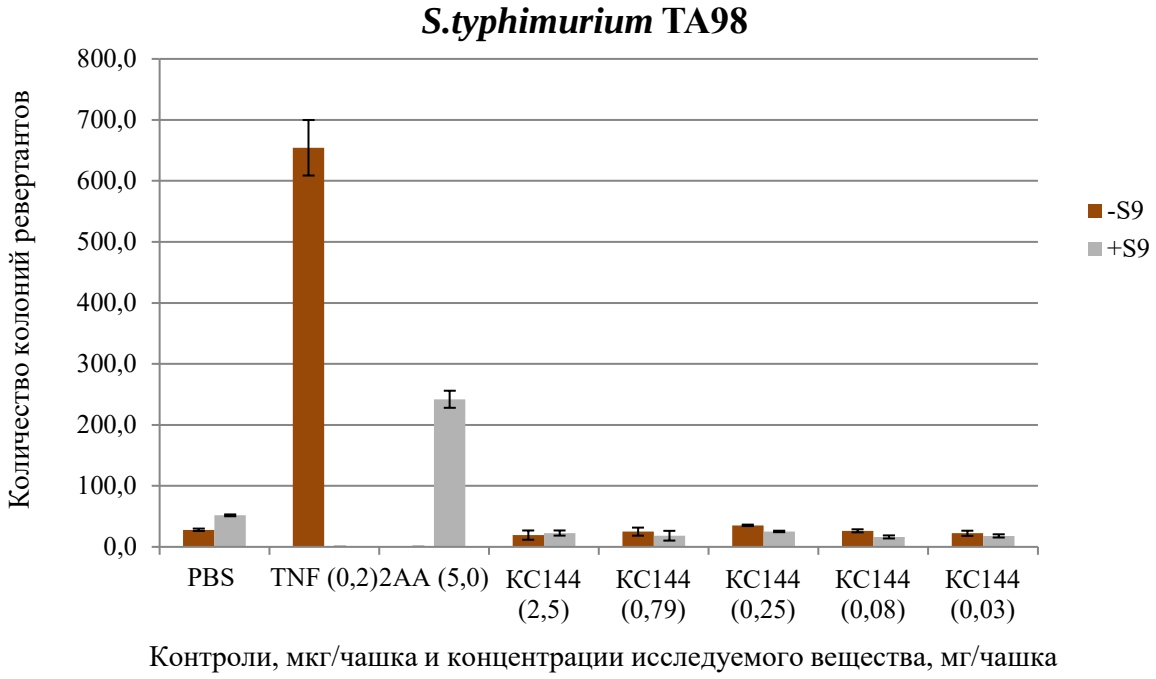


Рисунок 26 – Мутагенная активность субстанции КС-144 на штамме *S. typhimurium* TA98 с или без метаболической активации S9

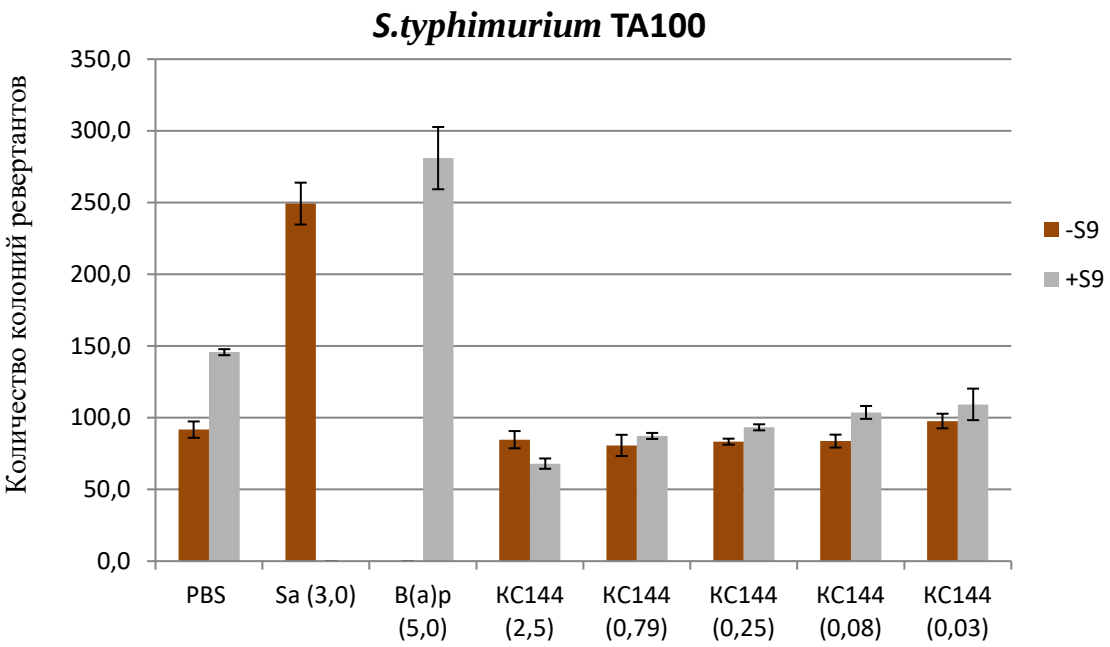


Рисунок 27 – Мутагенная активность субстанции КС-144 на штамме *S. typhimurium* TA100 с или без метаболической активации S9

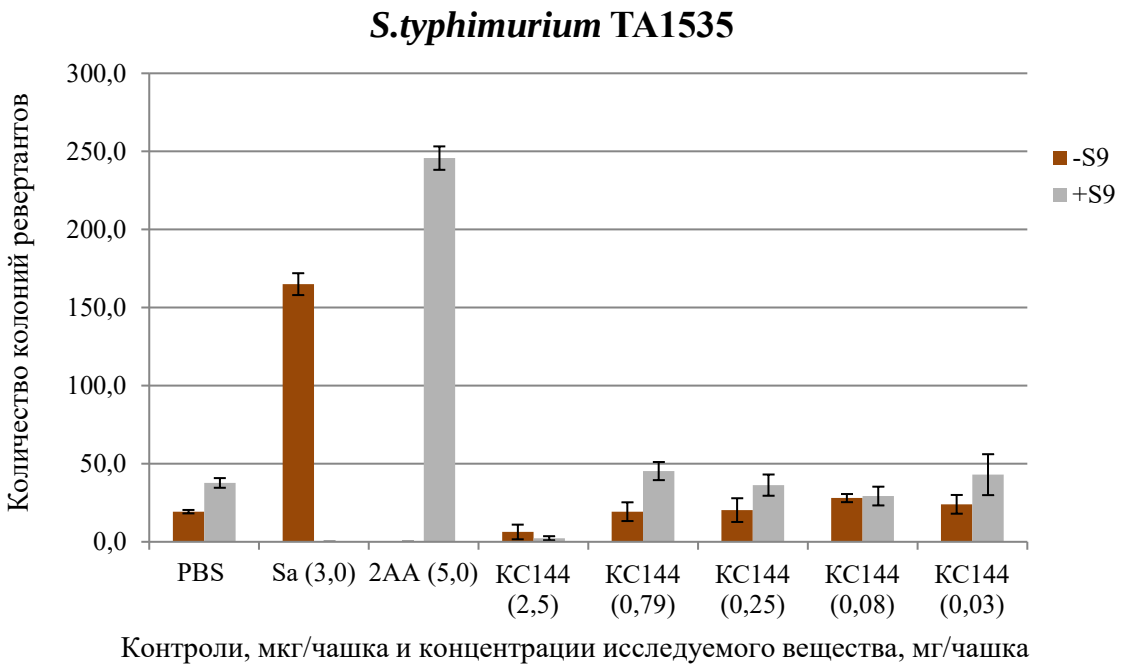


Рисунок 28 – Мутагенная активность субстанции КС-144 на штамме *S. typhimurium* TA1535 с или без метаболической активации S9

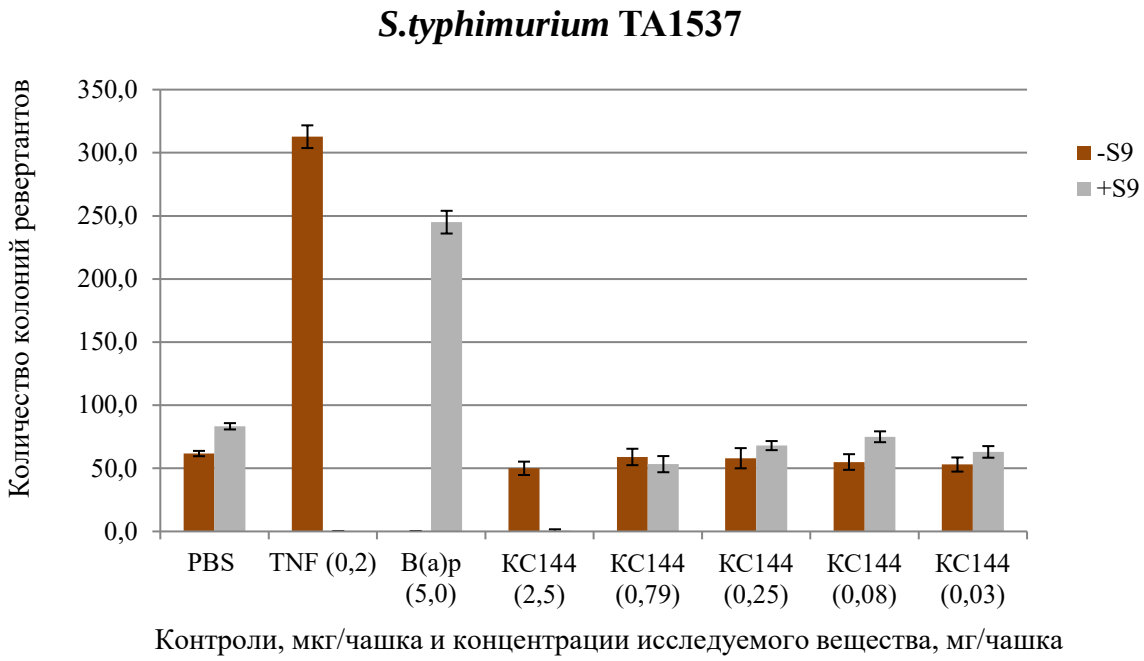


Рисунок 29 – Мутагенная активность субстанции КС-144 на штамме *S. typhimurium* TA1537 с или без метаболической активации S9

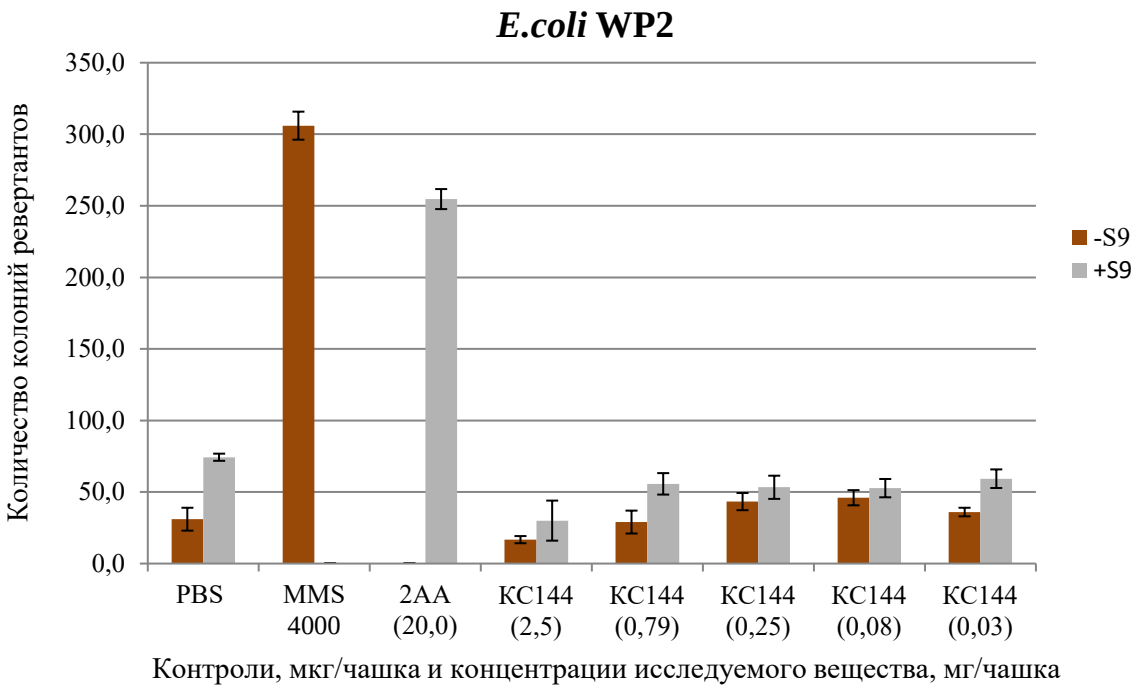


Рисунок 30 – Мутагенная активность субстанции КС-144 на штамме *E. coli* WP2 с или без метаболической активации S9

Тестовые штаммы TA100 и TA1535 выявляют потенциальные мутационные изменения в целевом положении G-C (гуанин-цитозин) гена гистидина. В литературе достаточно ясно показано, что многие мутагенные агенты также изменяют пары оснований A-T (аденин-тимин) [270], а другие тестовые штаммы (TA98, TA1537) могут обнаруживать точечные мутации в нескольких копиях

гена hisG. Анализ обратной мутации триптофана *Escherichia coli* WP2 обнаруживает реверсию trp($^{-}$) в trp($^{+}$) в месте, блокирующем этап биосинтеза триптофана до образования антраниловой кислоты. Все различные штаммы WP2 несут одну и ту же пару оснований AT в критическом месте мутации в гене trpE [267, 271].

Согласно международными стандартами ICH и Руководству OЭСР 471 (2020), мутагенный потенциал нового иодсодержащего соединения, диллития (I) (1→4)-L-D-полиглюкан трииодида хлорида (КС-144), в тесте Эймса и микроядерных анализов *in vitro* определяется путем оценки увеличения количества ревертантных колоний по сравнению с контролем и наличия зависимости «доза-эффект». Наши результаты показывают, что КС-144 не обладает мутагенным или генотоксическим потенциалом. В тесте Эймса не наблюдалось значительного увеличения обратных мутаций в штаммах *S. typhimurium* и *E. coli*, как с метаболической активацией (S9 mix), так и без нее. Аналогично, микроядерный анализ *in vitro* в клетках мышиной лимфомы L5178Y TK+/- clone (3.7.2C) не показал увеличения частоты микроядер при концентрациях ниже цитотоксического порога. Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями, указывающими на то, что комплексы иода, включая КС-144, не являются генотоксичными [227, 272].

Хотя растворы иода могут окислять 8-оксо-7,8-дигидрогуанин [273] и образовывать иодированные производные с органическими молекулами [274], которые проявляют биологическую активность, например, индуцируют апоптоз [90, 275–277], не было показано, что иод повреждает ДНК. Также было показано, что иод расщепляет фосфоротиоированную ДНК в бактериях (фосфоротиоирование ДНК) [278]. Следует отметить, что немостиковый атом кислорода в фосфатном остове бактериальной ДНК может быть заменен серой, в результате чего образуется фосфоротиоатная ДНК (ПТ-ДНК) [279]. Однако иод, по-видимому, не повреждает ДНК, поскольку было показано, что использование буферных растворов I_3^- в качестве консервантов тканей не приводило к фрагментации ДНК [280].

Эти результаты соответствуют ожиданиям, поскольку гидролиз комплексов иода обычно генерирует различные ионы, включая гипоиодит [281]. Гипоиодит в основном воздействует на амино-, SH- и тионовые группы, а также на НАД(Ф)Н и восстановленные пиридиновые нуклеотиды [282]. Однако иодирование редко встречается в биологических системах и обычно затрагивает углеводородные цепи, а не нуклеиновые кислоты [264]. На основании этих наблюдений предполагается, что КС-144 не повреждает бактериальную ДНК напрямую, но может вызывать гибель клеток посредством механизма, включающего иодирование липидов и белков.

3.18 Механизм противоопухолевого действия КС-144

Проведены исследования механизма противоопухолевого действия КС-144 в отношении клеточной линии мезотелиомы P31res1.2. Показано, что КС-144 имеет апоптотическое действие на клеточную линию P31res1.2, в сравнении с

клетками К562. По проведенным исследованиям показано, что по мере увеличения концентрации КС-144 от 0,125 до 0,5 мг/мл возрастает и число клеток, вступающих в апоптоз. Установлено, что КС-144 индуцирует апоптоз клеток, причем данный эффект носит выраженный дозозависимый характер. Также показано, что КС-144 вызывает апоптоз у клеток плевральной мезотелиомы (P31, P31res1.2).

Также показано, что КС-144 вызывает дозозависимое накопление клеток в фазе G_0/G_1, в то время как доля клеток в фазе S и G_2/M уменьшалась. Ингибирование роста приводит к остановке клеточного цикла в фазе G_0/G_1. В частности, эти результаты позволяют понять механизм апоптоза раковых клеток, вызванного иодом и его производными. Обобщённый механизм действия КС-144 представлен на рисунке 31.

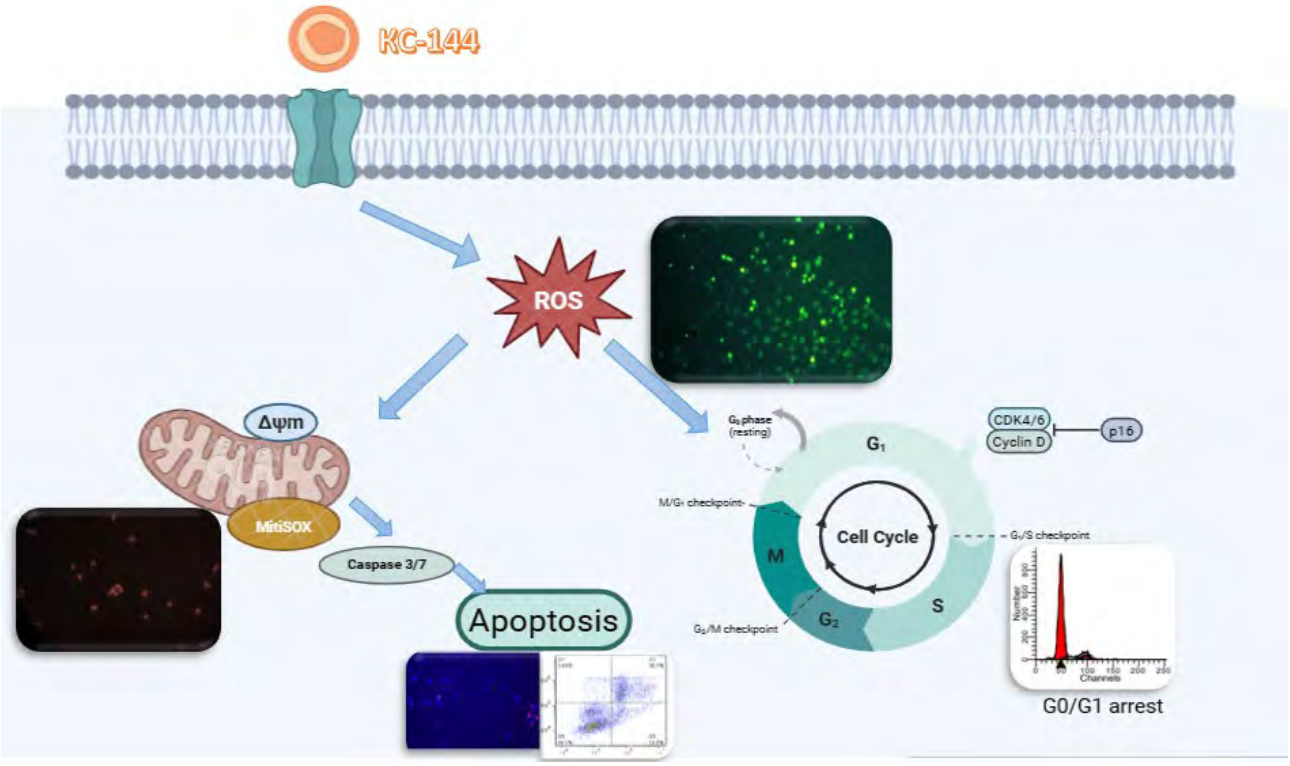


Рисунок 31 – Механизм действия КС-144 на клетки мезотелиомы P31res1.2

Остановка клеточного цикла раковых клеток в фазе G_0/G_1 может происходить в результате инактивации Akt пути и снижения уровня cyclinD1 и CDK4. Путь Akt регулирует пролиферацию клеток и прогрессирование клеточного цикла под влиянием белка p27/p21, который, в свою очередь, ингибирует активацию циклических комплексов D-CDK4. Это приводит к остановке клеточного цикла в фазах G_0/G_1, теряя способность к пролиферации. В соответствии с полученными данными, мы можем предположить, что происходит увеличение экспрессии белка p27/p21, регулирующего течение клеточного цикла.

Таким образом, в результате проведенных исследований, можно предположить, что дозозависимый апоптотический эффект координационных соединений иода обусловлен несколькими схожими механизмами:

1) КС-144 вызывает запуск потери митохондриального мембранного потенциала (Δψm), то есть деполяризация внутренней мембраны митохондрий, которое приводит к увеличению мембранной проницаемости раковых клеток.

2) КС-144 в концентрации 0,25 мг/мл увеличивает продукцию активных форм кислорода (АФК), что в свою очередь приводит в активации апоптотических сигнальных путей в клетках; при использовании набора флуоресцентных красителей ROS/RNS по определению разновидностей активных форм кислорода, показано сравнительное увеличение всех АФК, что приводит к общему усилению оксидативного стресса, следствием которого также является апоптозная клеточная гибель.

3) Механизм апоптоза, вызываемый КС-144, также связан с остановкой клеточного цикла в пресинтетическом периоде интерфазы с переходом в G_0/G_1 фазу, что было показано в анализе митотического цикла через сравнение количества клеток в разных периодах цикла.

Рациональная основа применения КС-144 связана с его способностью преодолевать митохондриально-опосредованные механизмы устойчивости опухолевых клеток к цисплатину. В основе его действия лежит направленное нарушение митохондриального редокс-баланса, которое запускает последовательный каскад клеточных нарушений, включающий дисфункцию митохондрий, остановку клеточного цикла и последующую гибель даже резистентных опухолевых клеток. Такой механизм действия позволяет рассматривать КС-144 как перспективный кандидат для разработки терапии устойчивых форм плевральной мезотелиомы.

3.19 Острая токсичность и противоопухолевая активность КС-144 *in vivo*

После изучения физико-химических свойств и биологической активности *in vitro* субстанции КС-144 с потенциальной противоопухолвой активностью для установления фармакологической активности были проведены исследования на лабораторных животных. Предварительную оценку токсичности и определения максимальной-переносимой дозы (МПД) КС-144 проводили на крысах [195].

3.19.1 Изучение острой токсичности КС-144

Острая токсичность субстанции КС-144 определялась согласно требованиям руководства OECD № 423 [281], а также согласно Приказу Министра здравоохранения и социального развития Республики Казахстан от 27 мая 2015 года № 392. На основе полученных предварительных данных по острой токсичности КС-144 на мышах выбранная стартовая доза для крыс составила 2000,0 мг/кг, конечная доза – 4000 мг/кг. Введение доз КС-144, превышающих 4000 мг/кг, не представлялось возможным из-за ограниченного максимального объема внутрижелудочно вводимой суспензии, а также ограничениями, связанными с растворимостью исследуемой субстанции в воде (вводимый раствор не должен быть очень вязким). В связи с этим точное значение $ЛД_{50}$ экспериментально не определяли.

После однократного внутрижелудочного введения КС-144 наблюдение за животными осуществлялось в течение 15 суток. После перорального введения крысам КС-144 в дозах 2000, 3000 мг/кг в течение первых 6 часов наблюдались клинические признаки, которые проявлялись в виде сбивания животных в группы, затрудненного дыхания, резко повышенной реакции на внешние раздражения (шум). Все симптомы полностью исчезали через сутки [193]. Внутрижелудочное введение 4000 мг/кг КС-144 у крыс в течение первых двух суток вызывало диспноэ, тахикардию и атаксию. Смертность животных не отмечалась. После перорального введения крысам КС-144 в дозах 2000, 3000 мг/кг в течение первых 6 ч наблюдались токсические симптомы, которые проявлялись в виде сбивания животных в группы, затрудненного дыхания, резко повышенной реакции на внешние раздражения (шум). Все симптомы имели транзиторный характер и проходили через сутки. Динамика изменения массы тела животных в ходе эксперимента представлена в таблице 17.

Таблица 17 – Изменение массы тела крыс после однократного внутрижелудочного введения исследуемого вещества КС-144

Группы	**Доза, мг/кг**	**Средняя масса животных, г**		
		1 сутки	**7 сутки**	**15 сутки**
Контроль	0	178,5±2,44	199,2±1,44	217,8±1,48
Опытная 1	2000	177,1±4,76	193,9±4,73	213,4±4,77
Опытная 2	3000	178,8±2,28	194,2±4,86	212,9±5,45
Опытная 3	4000	179,6±9,55	188,3±10,8	206,5±11,7

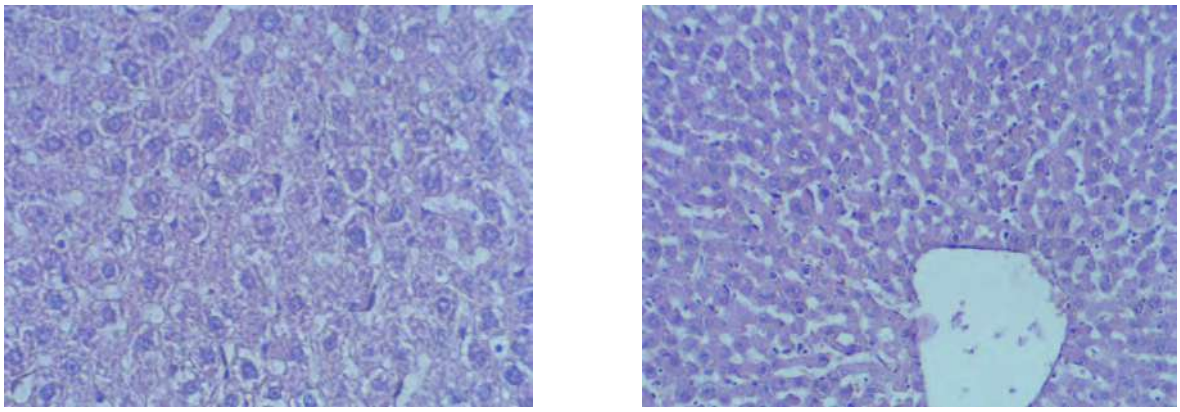
Исследование динамики массы тела крыс, получавших однократную внутрижелудочную дозу субстанции КС-144 в количестве 2000, 3000 и 4000 мг/кг, статистически значимого снижения массы тела по сравнению с контрольной группой не выявлялось. Увеличение массы тела было несколько менее выраженным в группе, получавшей самую высокую исследованную дозу, 4000 мг/кг, но эта тенденция не сопровождалась статистически значимыми различиями между группами. Таким образом, однократное введение КС-144 в исследованном диапазоне доз не вызывало значительных или длительных нарушений динамики массы тела у животных, что может свидетельствовать об отсутствии выраженного общего токсического эффекта вещества в исследованном диапазоне доз.

На 15-й день эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии, после чего оценивались локализация, внешний вид, размер, цвет и наличие макроскопических изменений во внутренних органах, протокол исследования (Приложение Н).

Локализация внутренних органов животных во всех экспериментальных группах соответствовала нормальному анатомическому виду и не отличалась от контрольной группы. При макроскопическом исследовании видимых патологических изменений во внутренних органах обнаружено не было.

Для детальной оценки органоспецифических токсических эффектов КС-144 было проведено микроскопическое исследование основных органов-мишеней воздействия иода – печени, почек и щитовидной железы.

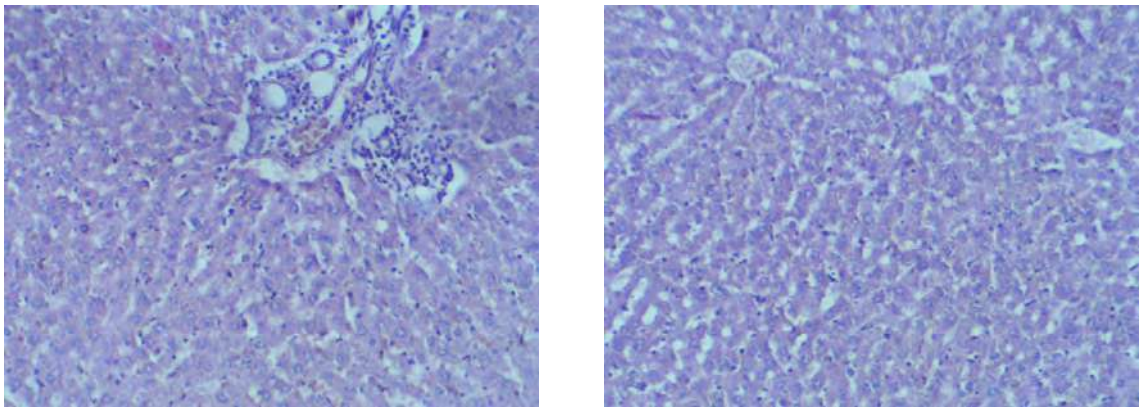
Микроскопическое исследование печени животных, получавших КС-144 в дозах 2000 и 3000 мг/кг, не выявили значительных изменений относительно контрольной группы. Балочное строение печени было сохранено, синусоиды расширены, также отмечалось расширение пространства Диссе, что свидетельствовало о наличии умеренных сосудисто-стромальных изменений (рисунок 32).



а б

Рисунок 32 – Гистоструктура печени крыс, получавших перорально субстанцию КС-144 в дозах 2000 (а) и 3000 (б) мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: а) × 400; б) × 200

При введении КС-144 в дозе 4000 мг/кг морфологические изменения печени были более выраженными. В печени при однократном введении КС-144 в дозе 4000 мг/кг наблюдалось неравномерное кровенаполнение сосудов. Балочное строение печени сохранено, синусоиды резко расширены, наблюдалось расширение пространства Диссе, активация клеток Купфера. В портальном тракте в зоне триад наблюдается лимфогистиоцитарная инфильтрация и перивасулярный отек (рисунок 33).



а б

Рисунок 33 – Гистоструктура печени крыс, получавших перорально субстанцию КС-144 в дозе 4000 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: × 200

Таким образом, выраженность морфологических изменений в печени увеличивалась с повышением дозы КС-144 и была наиболее заметной при самой высокой исследованной дозе, 4000 мг/кг. Однако существенных нарушений общей структуры органа не наблюдалось.

При микроскопическом исследовании почек крыс, получавших КС-144 в дозе 2000 и 3000 мг/кг, в паренхиме органа наблюдалось полнокровие крупных сосудов, единичные геморрагии. Почечные тельца полнокровны, несколько разрыхлены (сегментированы). У большинства клубочков мочевое пространство сужено. В проксимальных канальцах отмечается присутствие гиалиновых цилиндров (рисунки 34 и 35).

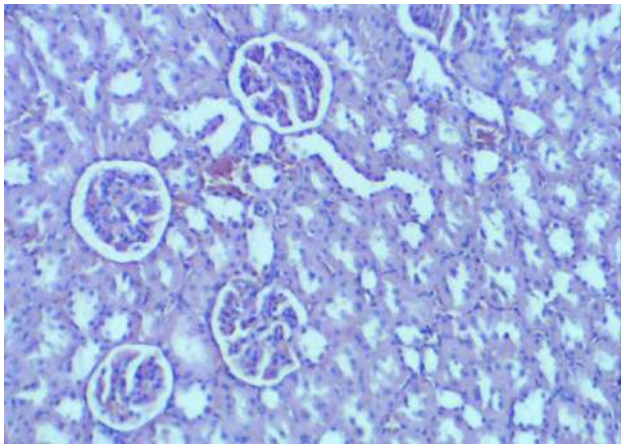
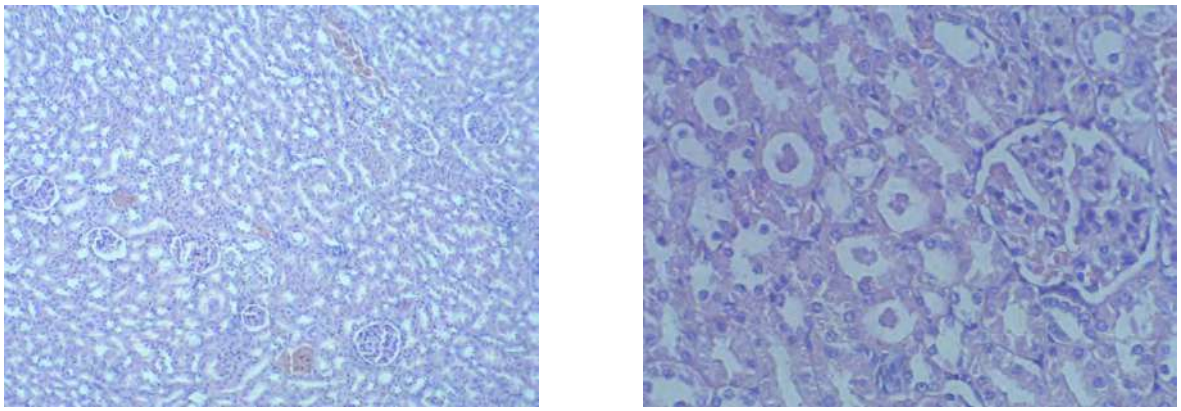


Рисунок 34 – Гистоструктура почек крыс, получавших перорально субстанцию КС-144 в дозе 2000 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином.
Увеличение: × 200



а б

Рисунок 35 – Гистоструктура почек крыс, получавших перорально субстанцию КС-144 в дозе 3000 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином.
Увеличение: а) × 100; б) × 400

После однократного перорального введения КС-144 в дозе 4000 мг/кг, в почках при микроскопическом исследовании в паренхиме наблюдалось сильное кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла, встречаются очаги

кровоизлияния. Почечные тельца умеренно полнокровны, несколько разрыхлены (сегментированы). В проксимальных канальцах отмечается присутствие гиалиновых цилиндров (рисунок 36).

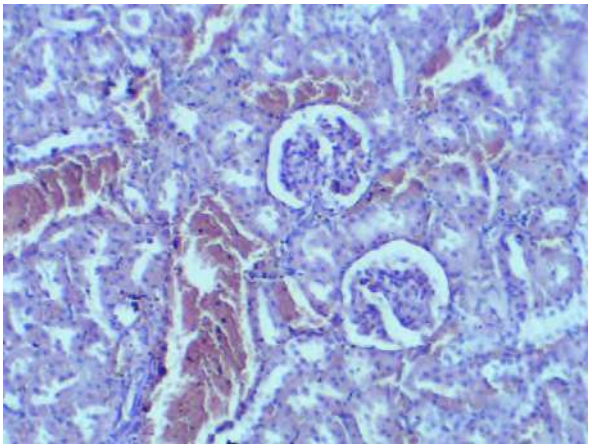


Рисунок 36 – Гистоструктура почек крыс, получавших перорально субстанцию КС-144 в дозе 4000 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: × 200

Полученные данные свидетельствовали о преимущественно сосудистых изменениях в почечной ткани, тяжесть которых возрастала при введении максимальной исследованной дозы КС-144.

Патогенетическое действие КС-144 во всех дозах характеризовалось гетерогенностью формы фолликулов (рисунок 37). Наблюдалась незначительная пролиферативная активность тироцитов. Была зафиксирована резорбция коллоида. Сосуды капсулы и перегородок были увеличены. Как правило, однократное воздействие иода даже в сверхвысоких дозах вызывало лишь транзиторные изменения в ткани щитовидной железы [283].

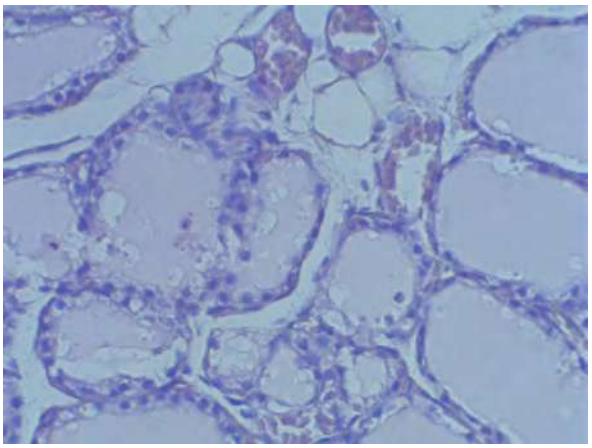


Рисунок 37 – Гистоструктура щитовидной железы крыс, получавших перорально субстанцию КС-144 в дозе 2000 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: × 400

Также, была оценена относительная масса внутренних органов животных. Статистически значимых различий в относительной массе сердца, печени, почек, легких и селезенки между контрольной и экспериментальной группами обнаружено не было (таблица 18).

Таблица 18– Показатели относительного веса органов к общей массе тела у крыс (г/г)

Орган	Группы животных			
	Контрольная	Опытная 1 КС-144 2000 мг/кг	Опытная 2 КС-144 3000 мг/кг	Опытная 3 КС-144 4000 мг/кг
Сердце	0,40±0,02	0,41±0,05	0,38±0,03	0,36±0,04
Печень	4,10±0,29	4,52±0,74	4,41±0,12	4,47±0,29
Почки	0,96±0,05	0,97±0,05	0,89±0,08	0,94±0,11
Легкие	0,70±0,06	0,69±0,05	0,66±0,05	0,69±0,05
Селезенка	0,51±0,07	0,49±0,07	0,58±0,07	0,59±0,06

Результаты исследования показали, что однократное внутрижелудочное введение КС-144 в диапазоне доз 2000 - 4000 мг/кг вызывало значительных изменений в гистроструктуре органов-мишеней. Транзиторные признаки токсичности наблюдались во всех экспериментальных группах и становились более выраженными с увеличением дозы до 4000 мг/кг. Статистически значимого снижения массы тела или изменений относительной массы внутренних органов не было обнаружено. Однако гистологическое исследование выявило дозозависимые сосудисто-стромальные и дегенеративные изменения, которые были наиболее выражены при максимальной исследованной дозе.

Значение $ЛД_{50}$ экспериментально не определено, поскольку при максимально достижимой дозе 4000 мг/кг смертность не наблюдалась. Следовательно, в условиях исследования значение $ЛД_{50}$ превысило 4000 мг/кг.

Поэтому на основании полученных результатов было принято, что $ЛД_{50}$ для КС-144 превышает 4000 мг/кг, а МПД равна этому значению. Согласно рекомедации данной в руководстве [195], стартовой дозой в исследовании эффективности КС-144 на модели рака была принята доза 1/10 от МПД или 400 мг/кг.

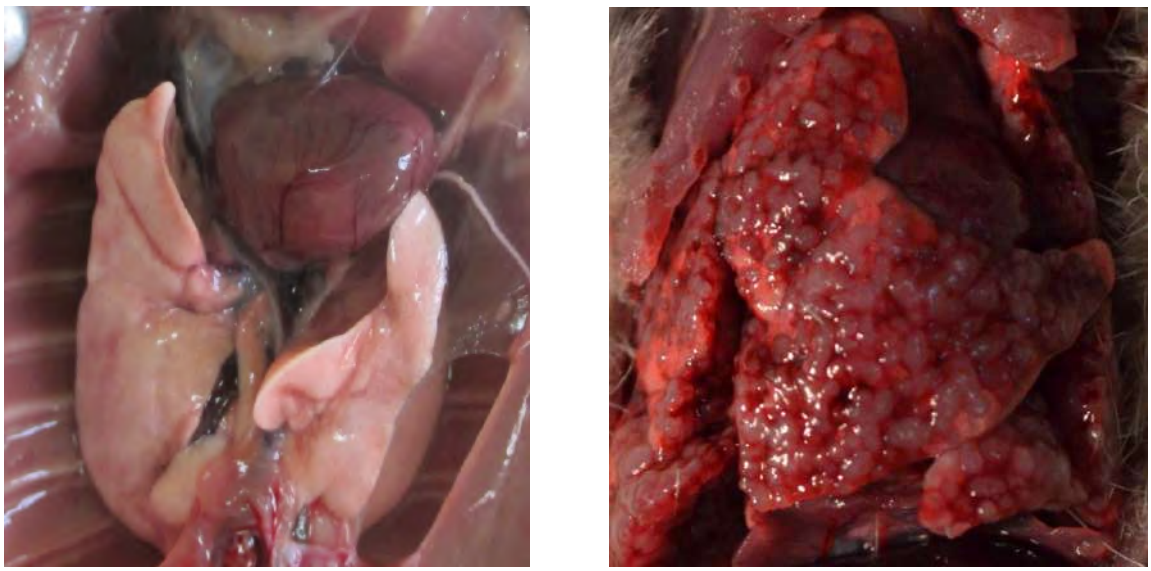
3.19.2 Предварительная оценка эффективности КС-144 в комбинации с доксорубицином на модели карциномы яичников крыс

После определения максимально переносимой дозы КС-144 следующим шагом стала предварительная оценка его противоопухолевой активности *in vivo*, в том числе при использовании в комбинации с доксорубицином [193]. В качестве экспериментальной модели использовалась аффинная опухоль яичников крыс (АфОЯ).

Перед экспериментами *in vivo* клетки АфОЯ, выделенные из асцитической жидкости, были подвергнуты цитологическому исследованию, и была предварительно оценена их чувствительность к КС-144 и ряду противоопухолевых препаратов. Суспензию клеток АфОЯ в концентрации 3×10^5 клеток в 200 мкл фиксирующей смеси, наносили на предметное стекло. После этого образцы окрашивали 3% раствором Гимзы в течение 8 - 10 мин. Цитологический анализ клетки низкодифференцированной опухоли яичника крыс исследовали под микроскопом Leica DM2500. Предварительные исследования показали, что АФОЯ характеризуется низкой и промежуточной чувствительностью к КС-144, этопозиду, метотрексату, цисплатину, доксорубицину, и относительно чувствительна к циклофосфамиду. Эти данные позволили нам охарактеризовать начальную чувствительность опухолевой модели к лекарственным препаратам до проведения экспериментов *in vivo*.

Клетки АФОЯ является аффинетенным к яичникам и брюшины. Однако после внутривенного введения значительная часть циркулирующих опухолевых клеток первоначально остается в микрососудах легких, впоследствии колонизируя легочную ткань и образуя множественные опухолевые узлы. Эта особенность модели внутривенного введения обеспечивает рецидив развития опухоли в легких и позволяет использовать тяжесть поражений легких в качестве одного из критериев оценки противоопухолевого эффекта изучаемых режимов лечения.

В эксперименте *in vivo* после перевивки АфОЯ, макроскопическое исследование материала показало, что у здоровых животных легкие воздушные, без уплотнений на ощупь, бледно-розовой окраски (рисунок 38А). После внутривенного введения АфОЯ располагается на легких в виде колоний узелкового типа и формирует многочисленные легочные метастазы [193]. Наблюдается объемный солидный опухолевый компонент, заполнение легкого опухолевыми клетками (рисунок 38Б).



А Б

Рисунок 38 – Макроскопический снимок легких у экспериментальных животных, А – легкое здоровой крысы. Б – легкое с опухолью АфОЯ

Прививаемость асцитной опухоли яичников составила 100% по всем группам [193]. День перевивки опухоли считали нулевым. В процессе всего эксперимента проводилось ежедневное наблюдение за животными. Данные, полученные при наблюдениях за соматическими реакциями крыс из контрольной группы здоровых животных в течение 70 суток, не выявили каких-либо отклонений в их состоянии и поведении. Потребление корма крысами, их двигательная активность и другие признаки поведения были в норме [193].

Ежедневные наблюдения за животными из групп с опухолью показали, что в первую неделю животные из всех групп, кроме здоровых, снизили потребление еды и воды, затем потребление корма и воды постепенно восстанавливалось до исходного уровня. Через две недели после применения доксорубицина и КС-144 в различных дозах у животных во всех группах отмечалось затрудненное дыхание, сбивание в кучу, животные более вяло вели себя при осмотрах. Коэффициент прироста массы крыс к концу эксперимента представлен в таблице 19.

Таблица 19 – Коэффициент прироста массы крыс в эксперименте

Группы животных	**Коэффициент, %**
Контрольная группа 1 (здоровые)	64,0**
Контрольная группа 2, нелеченые с АфОЯ	6,8
Доксорубицин 8,3 мг/кг	3,3
КС-144 400,0 мг/кг	20,5**
КС 4,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг	19,7**
КС 40,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг	26,3**
КС 400,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг	27,3**
Примечание - **p <0,01 в сравнении с группой Доксорубицин	

Следует отметить, что при использованном внутривенном способе перевивки АфОЯ оценка эффективности по объёму первичного опухолевого узла не являлась применимой, поскольку модель характеризовалась преимущественным метастатическим поражением лёгких. Поэтому в качестве основного интегрального критерия противоопухолевой эффективности была выбрана продолжительность жизни животных. Такой подход позволял оценить влияние терапии на общее течение метастатического опухолевого процесса, тогда как прирост массы тела рассматривался как дополнительный показатель общего состояния животных.

Сохранение или прирост массы тела у крыс, получавших КС-144, может отражать более благоприятное общее состояние животных на фоне терапии, однако данный показатель рассматривали как вспомогательный, а не основной критерий противоопухолевой эффективности. Основным критерием противоопухолевой эффективности являлось оценка увеличения продолжительности жизни (УПЖ),

которая также выражалась кривой Каплана-Мейера. Достоверность различий между группами анализировали с применением log-rank теста.

Учёт смертности животных проводили в течение всего эксперимента. Средняя продолжительность жизни лабораторных животных также рассчитывалась с использованием методом Першином. В соответствии с выбранной методикой, в ходе эксперимента фиксировалось время смерти каждого животного, после чего рассчитывалась средняя продолжительность жизни в контрольной и экспериментальной группах. Влияние на продолжительность жизни считался значимым при УПЖ ≥ 25%.

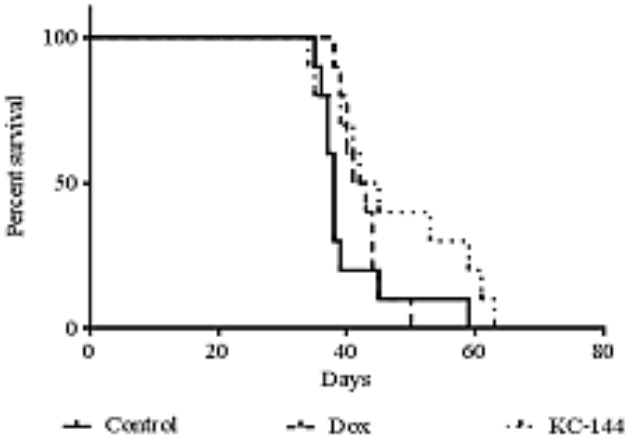
Эффективность исследуемой субстанции оценивали по его влиянию на продолжительность жизни животных и показатель увеличения продолжительности жизни. КС-144 вводили крысам внутрижелудочно в два приема в виде водного раствора, с интервалом в 12 ч. Суточные дозы составляли 400, 40 и 4 мг/кг, что соответствовало 1/10, 1/100 и 1/1000 от максимально переносимой дозы, установленной в предварительном эксперименте, МПД 4000 мг/кг (таблица 20).

Таблица 20 – Влияние КС-144 на увеличение средней продолжительности жизни лабораторных животных с метастатическим раком легких АфОЯ

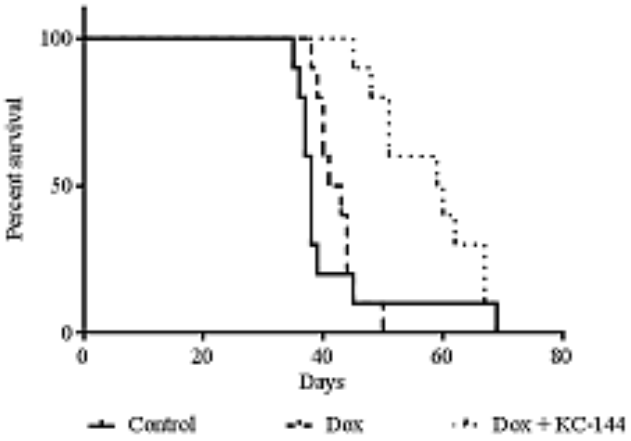
Группы животных (n=10)	**Средняя продолжительность жизни, дни**	**Увеличение средней продолжительности жизни, %**
Контроль (здоровые)	70,0	-
Контроль (АфОЯ) (без терапии)	37,6±0,5	-
Доксорубицин 8,3 мг/кг	40,6±0,9*	8,0
КС 400,0 мг/кг	49,7±3,4*	32,0
КС 4,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг	39,6±1,8	5,3
КС 40,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг	39,3±1,6	5,0
КС 400,0 мг/кг и доксорубицин 8,3 мг/кг	61,8±2,4*	64,0
Примечание - *p<0,05 в сравнении с нелеченными животными		

В таблице 20 представлены данные об эффективности лечения АфОЯ препаратом КС-144 включая комбинацию с доксорубицином. Наибольшая эффективность наблюдалась при 400 мг/кг, как в монорежиме, так и в комбинации с доксорубицином. Сравнение со здоровыми животными из контрольной группы не проводили, так как крысы были эвтаназированы в один день (70), соответственно применение описательной статистики не имеет смысла.

На рисунке 39 (А и В) представлены кривые Каплана-Мейера, иллюстрирующие выживаемость животных из трех групп: терапия только химиопрепаратом доксорубицин или лекарственным средством в суточной дозе 400 мг/кг и совместное действие доксорубицин с лекарственным средством в суточной дозе 400 мг/кг.



А) КС-144 в дозе 400 мг/кг



В) комбинированной терапии доксорубицина с КС-144 в дозе 400 мг/кг

Рисунок 39 – Кривая выживаемости Каплана-Мейера на крысах

Из графиков видно, что наилучшим эффектом обладает КС-144 в дозе 400,0 мг/кг в комбинации с доксорубицином с высоким уровнем достоверности ($p = 0,0032$). КС-144 в дозе 400,0 мг/кг также обладает противоопухолевым действием ($p = 0,03$).

Поскольку основной задачей данного исследования была оценка продолжительности жизни, конечной точкой была смерть лабораторных крыс. При некропсии чаще обнаруживались артефакты, связанные с трупным окоченением и аутолизом в тканях, в этой связи гистологические исследования не проводились.

Таким образом, на модели перевиваемой аффинитетной опухоли яичника крыс с метастатическим поражением лёгких была показана наибольшая противоопухолевая эффективность комбинированного применения КС-144 в дозе 400 мг/кг и доксорубицина в дозе 8,3 мг/кг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования по теме диссертационной работы проводились в рамках выполнения задач научно-технических программ «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2015–2017 гг.» (шифр НТП О.0671, № государственной регистрации 0115РК00390) и «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018–2020 гг.» (шифр НТП О.0777, № государственной регистрации 0118РК00003), реализованных АО «Научный центр противоинфекционных препаратов».

В результате выполнения диссертационной работы проведено комплексное исследование нового координационного соединения иода КС-144 – дилитий(I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид, включавшее *in silico* моделирование, разработку технологии получения, физико-химическую и спектроскопическую характеристику, оценку стабильности, изучение противоопухолевой активности и механизмов действия *in vitro*, генотоксического потенциала, острой токсичности и предварительной фармакологической эффективности *in vivo*.

На основании квантово-химического моделирования *in silico* был обоснован компонентный состав КС-144 и разработана технологическая схема его получения. В ходе исследования получены три экспериментальные серии субстанции, характеризовавшиеся воспроизводимыми физико-химическими и спектральными свойствами. Данные УФ-видимой, ИК- и Раман-спектроскопии согласуются с присутствием иодидных, трииодидных и полииодидных форм и их стабилизацей в полисахаридно-пептидной матрице. Совокупность расчетных и спектроскопических данных согласуется с комплексным характером взаимодействий между иодсодержащими формами, ионами лития и полисахаридно-пептидной матрицей посредством нековалентных и координационных взаимодействий.

Установлены основные физико-химические и фармацевтические характеристики полученной субстанции. Сухая субстанция КС-144 представляла собой однородный порошок коричнево-фиолетового цвета со слабым запахом иода, растворимый в воде в соотношении 1 г/20 мл. Содержание иода и иодида составляло соответственно 7,13 и 10,72 г/л. Воспроизводимость свойств трех экспериментальных серий подтверждала стабильность разработанного технологического процесса. При хранении в течение 12 месяцев при температуре 25±2°C и относительной влажности 60±5% контролируемые физико-химические и микробиологические показатели сохранялись в пределах установленных требований, что позволяет рассматривать разработанную субстанцию как основу для дальнейшей фармацевтической разработки лекарственных форм.

Исследование биологической активности показало, что КС-144 обладал цитотоксической и антипролиферативной активностью в отношении опухолевых клеток различного происхождения. Субстанция КС-144 проявила наибольшую цитотоксичность в отношении суспензионных культур клеток лейкемии и В-клеточной лимфомы (K562 и Raji), с $ЦТК_{50}$ - 0,309±0,036 мг/мл и 0,195±0,016

мг/мл, соответственно. А также двух клеточных линий рака мезотелиомы, чувствительной (P31) и резистентной к цисплатину (P31res1.2), с $ЦТК_{50}$ 0,306±0,052 мг/мл и 0,465±0,167 мг/мл, соответственно.

В качестве целевой *in vitro* тест системы выбраны клетки плевральной мезотелиомы (ПМ), которая является агрессивным и часто фатальным онкологическим заболеванием. Для изучения фармакологической активности использована экспериментальная модель аффинитетной опухоли (карцинома) яичников крыс (АфОЯ) с метастазированием в легкие. Предложен механизм действия, который реализуется активацией апоптоза, а также прямым воздействием иода на митохондрии клеток. Разработка и исследование новой лекарственной субстанции КС-144 проводили в лабораториях, аккредитованных и сертифицированных по правилам Надлежащей лабораторной практики Организации экономического сотрудничества и развития «Надлежащая лабораторная практика» (Приложение Д и Приложение Е).

Полученные результаты представляют особый интерес в связи с сохранением биологической активности соединения в клетках с приобретенной устойчивостью к цисплатину и позволяют предполагать участие механизмов, отличающихся от классического ДНК-повреждающего действия препаратов платины.

Важным результатом работы стало установление способности КС-144 потенцировать действие стандартных противоопухолевых препаратов. При комбинированном воздействии КС-144 с доксорубицином на клетки K562 и с цисплатином на клетки мезотелиомы P31 и P31res1.2 были выявлены отдельные диапазоны концентраций с синергическим взаимодействием при отсутствии признаков антагонизма. Для комбинации КС-144 с доксорубицином на клетках K562 значения индекса FIC составляли 0,472 - 0,498, а для комбинации КС-144 с цисплатином на клетках P31 значение FIC 0,450 - 0,457. В отдельных экспериментальных сочетаниях применение КС-144 позволяло уменьшить эффективные концентрации цитостатиков, что обосновывает дальнейшее изучение соединения не только в качестве самостоятельного противоопухолевого агента, но прежде всего как потенциального компонента комбинированной терапии.

Комплексное исследование молекулярно-клеточных механизмов показало, что цитотоксическое действие КС-144 сопровождалось выраженной индукцией апоптоза. В клетках K562 при воздействии КС-144 в концентрациях 0,125 и 0,25 мг/мл доля клеток на ранней стадии апоптоза достигала 95,0 - 97,5%, а повышение концентрации соединения сопровождалось увеличением доли клеток на поздних стадиях апоптотической гибели. Аналогичная дозозависимая проапоптотическая активность была выявлена в цисплатин-резистентной линии P31res1.2.

Дополнительные исследования свидетельствовали о вовлечении митохондриального и окислительно-восстановительного компонентов в реализацию биологического действия КС-144. В клетках P31res1.2 воздействие соединения сопровождалось изменением митохондриального мембранного

потенциала, повышением продукции митохондриального супероксида и изменением показателей клеточного редокс-состояния. Одновременно наблюдалось перераспределение клеточной популяции с увеличением доли клеток в G_0/G_1-фазе клеточного цикла. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что действие КС-144 связано с нарушением функционального состояния митохондрий и редокс-гомеостаза опухолевых клеток с последующим запуском апоптотической гибели и торможением клеточной пролиферации. При этом отсутствие выраженных изменений уровня исследованных белков цитохрома C, p21, Cyclin D1 и CDK4 в условиях проведенного Western blot анализа указывает на необходимость дальнейшего уточнения отдельных молекулярных звеньев данного механизма.

При оценке безопасности КС-144 в стандартных тест-системах *in vitro* мутагенный и генотоксический потенциал в исследованном диапазоне концентраций не выявлен. В тесте Эймса КС-144 не увеличивал число ревертантных колоний *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* как при наличии, так и при отсутствии метаболической активации S9. В микроядерном тесте на клетках мышиной лимфомы L5178Y $TK^{+/-}$ clone 3.7.2C в нецитотоксическом диапазоне концентраций 0,02 - 0,25 мг/мл статистически значимого увеличения частоты образования микроядер также не установлено.

Исследование острой токсичности показало, что при однократном внутрижелудочном введении КС-144 крысам в дозах от 2000 до 4000 мг/кг летальные исходы отсутствовали. Наблюдавшиеся клинические проявления токсичности носили преимущественно транзиторный характер и становились более выраженными при максимальной исследованной дозе. При этом гистологически выявлялись дозозависимые сосудисто-стромальные и дегенеративные изменения, наиболее выраженные при дозе 4000 мг/кг. В связи с отсутствием гибели животных точное значение $ЛД_{50}$ экспериментально определить не представлялось возможным; в условиях проведенного исследования оно превышало 4000 мг/кг. Максимальная исследованная переносимая доза 4000 мг/кг была использована для обоснования выбора дозы 400 мг/кг при последующей оценке фармакологической активности.

Предварительная противоопухолевая эффективность КС-144 была подтверждена *in vivo* на экспериментальной модели перевиваемой аффинитетной опухоли яичников крыс с метастатическим поражением легких. У нелеченых животных средняя продолжительность жизни составляла 37,6±0,5 суток. Применение КС-144 в дозе 400 мг/кг в монорежиме увеличивало данный показатель до 49,7±3,4 суток, что соответствовало увеличению продолжительности жизни на 32%. Наиболее выраженный терапевтический эффект зарегистрирован при сочетании КС-144 в дозе 400 мг/кг с доксорубицином в дозе 8,3 мг/кг: средняя продолжительность жизни животных достигала 61,8±2,4 суток, а увеличение продолжительности жизни относительно нелеченого контроля составило 64%. Анализ выживаемости методом Каплана–Мейера подтвердил статистическую значимость эффекта комбинированной терапии (p=0,0032).

Таким образом, результаты диссертационного исследования сформировали последовательное экспериментальное обоснование КС-144 как новой иодсодержащей фармацевтической субстанции с противоопухолевой активностью. Разработана технология получения КС-144, охарактеризованы физико-химические и спектральные свойства, подтверждена стабильность субстанции, определена цитотоксическая активность в отношении опухолевых клеток различного происхождения, включая цисплатин-резистентную модель, установлена способность КС-144 усиливать действие доксорубицина и цисплатина, а также показано вовлечение митохондриально- и АФК-зависимых механизмов в индукцию апоптотической гибели опухолевых клеток. Отсутствие выявленного генотоксического потенциала в использованных тест-системах, значение $ЛД_{50}$ более 4000 мг/кг в условиях исследования и подтверждение противоопухолевой активности *in vivo* формируют экспериментальные предпосылки для дальнейшего доклинического изучения КС-144.

Совокупность полученных данных позволяет рассматривать КС-144 прежде всего как перспективный компонент комбинированной противоопухолевой терапии. Наиболее значимыми характеристиками соединения являются сохранение биологической активности в отношении цисплатин-резистентных опухолевых клеток, возможность потенцирования действия стандартных цитостатиков и подтвержденное увеличение продолжительности жизни животных при сочетании с доксорубицином. Дальнейшие исследования должны быть направлены на уточнение молекулярных мишеней КС-144, количественное подтверждение отдельных звеньев митохондриально-опосредованного механизма действия, расширенную оценку безопасности и эффективности, а также разработку оптимальной лекарственной формы и режима комбинированного применения.

Разработанное координационное соединение защищено патентом Республики Казахстан № 35927 «Координационное соединение дилитий(I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид, обладающее противоопухолевым действием» (патент на изобретение РК № 35927, бюллетень №43 от 28.10.2022 г., Приложение А), что подтверждает практическую значимость и оригинальность разработанного подхода.

Оценка полноты решения поставленных задач

Все поставленные задачи были выполнены.

Рекомендации по конкретному использованию результатов

Рекомендуется использовать разработанную технологию получения вещества КС-144 в качестве основы для последующего масштабирования процесса и разработки опытно-промышленного регламента производства. Данные, полученные на трех экспериментальных сериях КС-144, могут быть использованы для обоснования воспроизводимости технологического процесса и определения основных параметров контроля на этапах синтеза, стабилизации, и получения сухой субстанции.

Установленные физико-химические и фармацевтические характеристики КС-144 целесообразно использовать при разработке спецификации качества

вещества и системы внутреннего контроля. Результаты 12-месячного исследования стабильности, проведенного при температуре 25 ± 2°C и относительной влажности 60 ± 5%, могут служить основой для планирования последующих исследований стабильности, уточнения срока годности и разработки требований к условиям хранения вещества.

Полученные результаты могут быть использованы при фармацевтической разработке лекарственной формы КС-144 для системного применения. На последующих этапах рекомендуется выбрать оптимальную лекарственную форму и состав вспомогательных веществ, изучить совместимость компонентов, усовершенствовать и валидировать методы количественного определения компонентов и контроля примесей, а также оценить стабильность и воспроизводимость дозирования в соответствии с применимыми рекомендациями ICH по качеству и фармацевтической разработке.

Учитывая *in vitro* потенцирование эффектов доксорубицина и цисплатина, включая его обнаружение в цисплатин-резистентной клеточной линии P31res1.2, а также 64%-ное увеличение выживаемости животных при применении КС-144 в дозе 400 мг/кг в комбинации с доксорубицином в дозе 8,3 мг/кг, рекомендуется использовать его в составе комбинированной противоопухолевой терапии в качестве приоритетного направления дальнейших исследований КС-144. Полученные данные могут быть использованы при планировании расширенных исследований эффективности, выборе оптимального соотношения доз и режимов совместного применения.

Для дальнейшего подтверждения противоопухолевой эффективности КС-144 рекомендуется расширить исследование на модели внутривенно перевиваемой аффинитетной опухоли яичника крыс (АфОЯ) с метастатическим поражением лёгких. Наряду с оценкой продолжительности жизни животных целесообразно включить количественную оценку метастатического процесса в лёгочной ткани, в том числе определение количества и площади опухолевых очагов, а также морфологическую оценку степени поражения лёгких. Такой подход позволит сопоставить увеличение продолжительности жизни с непосредственным влиянием терапии на выраженность метастатического процесса и более полно охарактеризовать противоопухолевую активность КС-144 в монотерапии и при комбинированном применении с доксорубицином.

Результаты теста Эймса, микроядерного теста, исследования острой токсичности и молекулярно-клеточных механизмов действия КС-144 могут служить исходной экспериментальной основой для дальнейшей доклинической разработки. Перспективными направлениями являются изучение токсичности при повторном введении, токсикокинетики и безопасности основных физиологических систем, а также уточнение митохондриально- и АФК-зависимого механизма действия с оценкой активации каспаз, высвобождения цитохрома c, расщепления PARP и регуляции клеточного цикла. Полученные результаты позволяют рассматривать КС-144 как перспективного кандидата для дальнейшей фармацевтической и доклинической разработки, прежде всего в составе комбинированной противоопухолевой терапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2024. – Т. 74. – № 3. – С. 229–263. – DOI: 10.3322/caac.21834.

2. Wang Y., He J., Lian S., Zeng Y., He S., Xu J., Luo L., Yang W., Jiang J. Targeting Metabolic–Redox Nexus to Regulate Drug Resistance: From Mechanism to Tumor Therapy // Antioxidants. – 2024. – Т. 13. – № 7. – С. 828. – DOI: 10.3390/antiox13070828.

3. Tian X., Srinivasan P. R., Tajiknia V., Sanchez Sevilla Uruchurtu A. F., Seyhan A. A., Carneiro B. A., De La Cruz A., Pinho-Schwermann M., George A., Zhao S., Strandberg J., Di Cristofano F., Zhang S., Zhou L., Raufi A. G., Navaraj A., Zhang Y., Verovkina N., Ghandali M., Ryspayeva D., El-Deiry W. S. Targeting apoptotic pathways for cancer therapy // Journal of Clinical Investigation. – 2024. – Т. 134. – № 14. – e179570. – DOI: 10.1172/JCI179570.

4. Adhikari S., Nath P., Das A., Datta A., Baildya N., Duttaroy A. K., Pathak S. A review on metal complexes and its anti-cancer activities: Recent updates from *in vivo* studies // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2024. – Т. 171. – 116211. – DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116211.

5. Elliyanti A., Hafizhah N., Salsabila D., Susilo V. Y., Setiyowati S., Tofrizal A., Kurniawati Y., Irrahmah M. Exploring the promising therapeutic benefits of iodine and radioiodine in breast cancer cell lines // Narra J. – 2024. – Т. 4. – № 3. – e1078. – DOI: 10.52225/narra.v4i3.1078.

6. Mendieta I., Leon-Pichardo J., Orizaga-Osti G., Juvera-Avalos E. R., Rangel-Chavez U., Delgado-Gonzalez E., Anguiano B., Aceves C. Molecular Iodine Exhibited Differential Antiproliferative Actions in Progenitor and Stem Populations from Chemoresistant Cancer Cells // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – № 9. – 4020. – DOI: 10.3390/ijms26094020.

7. Edis Z., Bloukh S. H., Sara H. A., Bloukh I. H. Green Synthesized Polymeric Iodophors with Thyme as Antimicrobial Agents // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – № 2. – 1133. – DOI: 10.3390/ijms25021133.

8. Spitaleri F., Dattilo S., Aleo D., Saita M. G., Patti A. Cyclodextrin-based iodophors with high iodine retention in solid state and in dilute solutions // Carbohydrate Polymers. – 2025. – Т. 349. – 122969. – DOI: 10.1016/j.carbpol.2024.122969.

9. Saffarionpour S., Diosady L. L. Cyclodextrins and their potential applications for delivering vitamins, iron, and iodine for improving micronutrient status // Drug Delivery and Translational Research. – 2025. – Т. 15. – № 1. – С. 26–65. – DOI: 10.1007/s13346-024-01586-x.

10. An X., Yu W., Liu J., Tang D., Yang L., Chen X. Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities // Cell Death & Disease. – 2024. – Т. 15. – № 8. – С. 556. – DOI: 10.1038/s41419-024-06939-5.

11. Li Z., Zhang W., Guo S., Qi G., Huang J., Gao J., Zhao J., Kang L., Li Q. A Review of Advances in Mitochondrial Research in Cancer // Cancer Control. – 2024. – T. 31. – 10732748241299072. – DOI: 10.1177/10732748241299072.

12. O'Leary B., Skinner H., Schoenfeld J. D., Licitra L., Le Tourneau C., Esdar C., Schroeder A., Salmio S., Psyrri A. Evasion of apoptosis and treatment resistance in squamous cell carcinoma of the head and neck // Cancer Treatment Reviews. – 2024. – T. 129. – 102773. – DOI: 10.1016/j.ctrv.2024.102773.

13. Du H., Xu T., Yu S., Wu S., Zhang J. Mitochondrial metabolism and cancer therapeutic innovation // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2025. – T. 10. – № 1. – C. 245. – DOI: 10.1038/s41392-025-02311-x.

14. Ju S., Singh M.K., Han S., Ranbhise J., Ha J., Choe W., Yoon K.S., Yeo S. G., Kim S.S., Kang I. Oxidative Stress and Cancer Therapy: Controlling Cancer Cells Using Reactive Oxygen Species // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – T. 25. – № 22. – 12387. – DOI: 10.3390/ijms252212387.

15. Turmakhanbetov B. M., Tokmurzieva G. Z., Kerimbaeva Z. A., Debnath R., Nogaeva M. G., Ongalova R., Tazhiyeva A. Incidence of malignant neoplasms and organizational aspects of cancer care in the Republic of Kazakhstan // Clinical Epidemiology and Global Health. – 2024. – T. 30. – 101838. – DOI: 10.1016/j.cegh.2024.101838.

16. Kwan S. Kazakhstan Sees Growth in Urban Cancer Cases - The Times of Central Asia [Электронный ресурс]. – 2025. – URL: https://timesca.com/kazakhstan-sees-growth-in-urban-cancer-cases/ (дата обращения: 06.04.2026).

17. Kazakh health official reveals latest cancer data [Электронный ресурс]. – Qazinform.com. – URL: https://qazinform.com/news/kazakh-health-official-reveals-latest-cancer-data-1c4379 (дата обращения: 06.04.2026).

18. Akhmedullin R., Aimyshev T., Zhakhina G., Yerdessov S., Beyembetova A., Ablayeva A., Biniyazova A., Seyil T., Abdukhakimova D., Segizbayeva A., Semenova Y., Gaipov A. In-depth analysis and trends of cancer mortality in Kazakhstan: a joinpoint analysis of nationwide healthcare data 2014–2022 // BMC Cancer. – 2024. – T. 24. – 1340. – DOI: 10.1186/s12885-024-13128-2.

19. Ablayeva A., Syssoyev D., Akhmedullin R., Beyembetova A., Abdukhakimova D., Aimyshev T., Arupzhanov I., Zhakhina G., Biniyazova A., Seyil T., Igissin N., Semenova Y., Gaipov A. Epidemiology of liver cancer in Kazakhstan: data from the Unified National Electronic Health System, 2014–2023 // PLOS One. – 2025. – T. 20. – № 8. – e0330423. – DOI: 10.1371/journal.pone.0330423.

20. Song J., Yang P., Chen C., Ding W., Tillement O., Bai H., Zhang S. Targeting epigenetic regulators as a promising avenue to overcome cancer therapy resistance // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2025. – T. 10. – № 1. – C. 219. – DOI: 10.1038/s41392-025-02266-z.

21. He J., Qiu Z., Fan J., Xie X., Sheng Q., Sui X. Drug tolerant persister cell plasticity in cancer: a revolutionary strategy for more effective anticancer therapies // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2024. – T. 9. – № 1. – C. 209. – DOI: 10.1038/s41392-024-01891-4.

22. Johnson D.B., Nebhan C.A., Moslehi J.J., Balko J.M. Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2022. – Т. 19. – № 4. – С. 254–267. – DOI: 10.1038/s41571-022-00600-w.

23. Akter S., Madhuvilakku R., Kar A.K., Nila I.S., Liu P., Inuzuka H., Wei W., Hong Y. Reactive oxygen species (ROS) in cancer: from mechanism to therapeutic implications // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2026. – Т. 11. – № 1. – С. 111. – DOI: 10.1038/s41392-026-02583-x.

24. Skrypnyk M., Yatsenko T., Riabets O., Zuieva O., Rodionova I., Skikevych M., Salama Y., Osada T., Tobita M., Takahashi S., Hattori N., Takahashi K., Hattori K., Heissig B. Potassium Iodide Induces Apoptosis in Salivary Gland Cancer Cells // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – № 11. – DOI: 10.3390/ijms26115199.

25. Abdolmaleki S., Aliabadi A., Khaksar S. Riding the metal wave: A review of the latest developments in metal-based anticancer agents // Coordination Chemistry Reviews. – 2024. – Т. 501. – 215579. – DOI: 10.1016/j.ccr.2023.215579.

26. Anand U., Dey A., Chandel A. K. S., Sanyal R., Mishra A., Pandey D. K., De Falco V., Upadhyay A., Kandimalla R., Chaudhary A., Dhanjal J. K., Dewanjee S., Vallamkondu J., Pérez de la Lastra J. M. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics // Genes & Diseases. – 2022. – Т. 10. – № 4. – С. 1367–1401. – DOI: 10.1016/j.gendis.2022.02.007.

27. Rose O., Croonenberg T., Clemens S., Hinteregger T., Eppacher S., Huber-Cantonati P., Garcia-Miralles M., Liuni R., Dossena S. Cisplatin-Induced Hearing Loss, Oxidative Stress, and Antioxidants as a Therapeutic Strategy—A State-of-the-Art Review // Antioxidants. – 2024. – Т. 13. – № 12. – 1578. – DOI: 10.3390/antiox13121578.

28. Elmorsy E.A., Saber S., Hamad R.S., Abdel-Reheim M.A., El-kott A.F., AlShehri M.A., Morsy K., Salama S.A., Youssef M.E. Advances in understanding cisplatin-induced toxicity: Molecular mechanisms and protective strategies // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2024. – Т. 203. – 106939. – DOI: 10.1016/j.ejps.2024.106939.

29. Zhong Y., Shuai Y., Yang J., Zhang M., He T., Zheng L., Yang S., Peng S. LOC730101 improves ovarian cancer drug sensitivity by inhibiting autophagy-mediated DNA damage repair via BECN1 // Cell Death & Disease. – 2024. – Т. 15. – № 12. – С. 893. – DOI: 10.1038/s41419-024-07278-1.

30. Adeyemi S.A., Ngema L.M., Choonara Y.E. Advances in targeted therapies and emerging strategies for blood cancer treatment // RSC Pharmaceutics. – 2025. – Т. 2. – № 5. – С. 950–961. – DOI: 10.1039/D5PM00090D.

31. Liu B., Zhou H., Tan L., Siu K. T.H., Guan X.Y. Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2024. – Т. 9. – № 1. – С. 175. – DOI: 10.1038/s41392-024-01856-7.

32. Garg P., Pareek S., Kulkarni P., Horne D., Salgia R., Singhal S. S. Next-Generation Immunotherapy: Advancing Clinical Applications in Cancer Treatment //

Journal of Clinical Medicine. – 2024. – Т. 13. – № 21. – 6537. – DOI: 10.3390/jcm13216537.

33. Ahuja S., Zaheer S. The evolution of cancer immunotherapy: a comprehensive review of its history and current perspectives // Korean Journal of Clinical Oncology. – 2024. – Т. 20. – № 2. – С. 51–73. – DOI: 10.14216/kjco.24009.

34. Bandara S., Raveendran S. Current Landscape and Future Directions in Cancer Immunotherapy: Therapies, Trials, and Challenges // Cancers. – 2025. – Т. 17. – № 5. – DOI: 10.3390/cancers17050821.

35. Oluwajembola A.M., Zakari S., Cleanclay W.D., Ayeni T., Adebosoye A., Okoh O.S., Folamade J., Bawa I., Ogunlana O.O. A Review of Novel Cancer Therapeutics and Current Research Trends // The Scientific World Journal. – 2025. – Т. 2025. – 5056618. – DOI: 10.1155/tswj/5056618.

36. Mc Neil V., Lee S.W. Advancing Cancer Treatment: A Review of Immune Checkpoint Inhibitors and Combination Strategies // Cancers. – 2025. – Т. 17. – № 9. – 1408. – DOI: 10.3390/cancers17091408.

37. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions // Cancer Discovery. – 2022. – Т. 12. – № 1. – С. 31–46. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

38. Vogler M., Braun Y., Smith V.M., Westhoff M.A., Pereira R.S., Pieper N.M., Anders M., Callens M., Vervliet T., Abbas M., Macip S., Schmid R., Bultynck G., Dyer M.J. The BCL2 family: from apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2025. – Т. 10. – № 1. – С. 91. – DOI: 10.1038/s41392-025-02176-0.

39. Ye Q., Zhuang X.Z., Li J., Zhou X. Targeting the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) to combat drug resistance in cancers // Frontiers in Pharmacology. – 2025. – Т. 16. – 1562167. – DOI: 10.3389/fphar.2025.1562167.

40. Carneiro B. A., El-Deiry W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy // Nature Reviews. Clinical Oncology. – 2020. – Т. 17. – № 7. – С. 395–417. – DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y.

41. Ergün S., Aslan S., Demir D., Kayaoğlu S., Saydam M., Keleş Y., Kolcuoğlu D., Taşkurt Hekim N., Güneş S. Beyond Death: Unmasking the Intricacies of Apoptosis Escape // Molecular Diagnosis & Therapy. – 2024. – Т. 28. – С. 403–423. – DOI: 10.1007/s40291-024-00718-w.

42. Saxena R., Welsh C.M., He Y.W. Targeting regulated cell death pathways in cancers for effective treatment: a comprehensive review // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2024. – Т. 12. – 1462339. – DOI: 10.3389/fcell.2024.1462339.

43. Liu D., Liu Z., Hu Y., Xiong W., Wang D., Zeng Z. MOMP: A critical event in cell death regulation and anticancer treatment // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. – 2025. – Т. 1880. – № 2. – 189280. – DOI: 10.1016/j.bbcan.2025.189280.

44. Mukherjee N., Sheetz J., Shellman Y. G. Targeting the BCL2 Family: Advances and Challenges in BH3 Mimetic-Based Therapies // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – № 20. – 9859. – DOI: 10.3390/ijms26209859.

45. Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis // Cell. – 1998. – Т. 94. – № 4. – С. 491–501. – DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81590-1.

46. Darmon A.J., Nicholson D.W., Bleackley R.C. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B // Nature. – 1995. – Т. 377. – № 6548. – С. 446–448. – DOI: 10.1038/377446a0.

47. Lu J., He R., Liu Y., Zhang J., Xu H., Zhang T., Chen L., Yang G., Zhang J., Liu J., Chi H. Exploiting cell death and tumor immunity in cancer therapy: challenges and future directions // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2024. – Т. 12. – 1416115. – DOI: 10.3389/fcell.2024.1416115.

48. Van Loo G., Schotte P., Van Gurp M., Demol H., Hoorelbeke B., Gevaert K., Rodriguez I., Ruiz-Carrillo A., Vandekerckhove J., Declercq W., Beyaert R., Vandenabeele P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation // Cell Death & Differentiation. – 2001. – Т. 8. – № 12. – С. 1136–1142. – DOI: 10.1038/sj.cdd.4400944.

49. Alan Mitteer R., Wang Y., Shah J., Gordon S., Fager M., Butter P.P., Jun Kim H., Guardiola-Salmeron C., Carabe-Fernandez A., Fan Y. Proton beam radiation induces DNA damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species // Scientific Reports. – 2015. – Т. 5. – № 1. – 13961. – DOI: 10.1038/srep13961.

50. Cao X., Wen P., Fu Y., Gao Y., Qi X., Chen B., Tao Y., Wu L., Xu A., Lu H., Zhao G. Radiation induces apoptosis primarily through the intrinsic pathway in mammalian cells // Cellular Signalling. – 2019. – Т. 62. – 109337. – DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.06.002.

51. Han J.Y., Chung Y.J., Kim J.S., Rhyu M. G., Kim H.K., Lee K.S., Park S.W. The relationship between cisplatin - induced apoptosis and p53, bcl - 2 and bax expression in human lung cancer cells // The Korean Journal of Internal Medicine. – 1999. – Т. 14. – № 1. – С. 42–52. – DOI: 10.3904/kjim.1999.14.1.42.

52. Qin L.F., Ng I.O. Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells // Cancer Letters. – 2002. – Т. 175. – № 1. – С. 27–38. – DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00720-0.

53. Ren Y.G., Wagner K.W., Knee D.A., Aza-Blanc P., Nasoff M., Deveraux Q.L. Differential Regulation of the TRAIL Death Receptors DR4 and DR5 by the Signal Recognition Particle // Molecular Biology of the Cell. – 2004. – Т. 15. – № 11. – С. 5064–5074. – DOI: 10.1091/mbc.e04-03-0184.

54. LeBlanc H.N., Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors // Cell Death & Differentiation. – 2003. – Т. 10. – № 1. – С. 66–75. – DOI: 10.1038/sj.cdd.4401187.

55. Aykin-Burns N., Ahmad I.M., Zhu Y., Oberley L.W., Spitz D.R. Increased levels of superoxide and H_2O_2 mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation // Biochemical Journal. – 2009. – Т. 418. – № 1. – С. 29–37. – DOI: 10.1042/BJ20081258.

56. Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W. W., Weinberg S., Joseph J., Lopez M., Kalyanaraman B., Mutlu G. M., Budinger G. R. S., Chandel N. S. Mitochondrial

metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Т. 107. – № 19. – С. 8788–8793. – DOI: 10.1073/pnas.1003428107.

57. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? // Nature Reviews Drug Discovery. – 2009. – Т. 8. – № 7. – С. 579–591. – DOI: 10.1038/nrd2803.

58. Trachootham D., Zhou Y., Zhang H., Demizu Y., Chen Z., Pelicano H., Chiao P.J., Achanta G., Arlinghaus R.B., Liu J., Huang P. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by β-phenylethyl isothiocyanate // Cancer Cell. – 2006. – Т. 10. – № 3. – С. 241–252. – DOI: 10.1016/j.ccr.2006.08.009.

59. Zhang J., Fu X., Jia F., Jing Y., Zhang J., Bai A., Cui M., Zhang L., Yao K. Mitochondrial orchestration of PANoptosis: mechanisms, disease pathogenesis, and emerging therapeutic frontiers // Cell Death Discovery. – 2025. – Т. 11. – С. 476. – DOI: 10.1038/s41420-025-02750-z.

60. Kamel A.G., Sabet S., El-Shibiny A. Potential mitochondrial ROS-mediated damage induced by chitosan nanoparticles bee venom-loaded on cancer cell lines // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – Т. 279. – 135362. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135362.

61. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents // Nature Reviews. Molecular Cell Biology. – 2020. – Т. 21. – № 7. – С. 363–383. – DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3.

62. Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2000. – Т. 32. – № 2. – С. 157–170. – DOI: 10.1016/s1357-2725(99)00088-6.

63. Sahu M., Jain U. ROS-mediated therapeutic approach through oxidative stress and cell signalling modulation // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2026. – Т. 220. – 105168. – DOI: 10.1016/j.critrevonc.2026.105168.

64. Raza M.H., Siraj S., Arshad A., Waheed U., Aldakheel F., Alduraywish S., Arshad M. ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2017. – Т. 143. – № 9. – С. 1789–1809. – DOI: 10.1007/s00432-017-2464-9.

65. Smyth P.P.A. Narrative review: iodine—thyroidal and extrathyroidal actions // Annals of Thyroid. – 2022. – Т. 7. – № 0. – DOI: 10.21037/aot-21-28.

66. Cuenca-Micó O., Delgado-González E., Anguiano B., Vaca-Paniagua F., Medina-Rivera A., Rodríguez-Dorantes M., Aceves C. Effects of Molecular Iodine/Chemotherapy in the Immune Component of Breast Cancer Tumoral Microenvironment // Biomolecules. – 2021. – Т. 11. – № 10. – 1501. – DOI: 10.3390/biom11101501.

67. Aceves C., Anguiano B., Delgado G. The Extrathyronine Actions of Iodine as Antioxidant, Apoptotic, and Differentiation Factor in Various Tissues // Thyroid. – 2013. – Т. 23. – № 8. – С. 938–946. – DOI: 10.1089/thy.2012.0579.

68. Zhang L., Shang F., Liu C., Zhai X. The correlation between iodine and metabolism: a review // Frontiers in Nutrition. – 2024. – Т. 11. – 1346452. – DOI: 10.3389/fnut.2024.1346452.

69. Moreno-Reyes R., Fuentes Peña C., Nuñez J.F., Sánchez M.B., Carvajal J.J., Roble K., Mendoza-León M.J., Rangel-Ramírez M.A., Opazo M.C., Lay M.K., Riedel C.A., Guzmán-Gutierrez E., Mackern-Oberti J.P., Jara E.L. Critical Role of Iodine and Thyroid Hormones During Pregnancy // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – № 21. – 10247. – DOI: 10.3390/ijms262110247.

70. Kara Ş.Ş., Yılmaz M., Cabar H.D. The Importance of Iodine for Thyroid Health. // Recent Advances in Thyroid Disorders. – IntechOpen. – 2025. – DOI: 10.5772/intechopen.1009097.

71. Shahid M.A., Ashraf M.A., Sharma S. Physiology, Thyroid Hormone. // StatPearls. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2026. – URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/ (дата обращения: 10.04.2026).

72. Küpper F.C., Carpenter L.J., McFiggans G.B., Palmer C.J., Waite T.J., Boneberg E.M., Woitsch S., Weiller M., Abela R., Grolimund D., Potin P., Butler A., Luther G.W., Kroneck P.M.H., Meyer-Klaucke W., Feiters M. C. Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105. – № 19. – С. 6954–6958. – DOI: 10.1073/pnas.0709959105.

73. Nurudeen S., Khan S., Khan M., Ali A., Fawy K., Marwani H., Ahmad S., Rahman M., Alalwiat A., Bajaber M. A comprehensive review on medicinal applications of iodine // Reviews in Inorganic Chemistry. – 2025. – Т. 45. – С. 1–13. – DOI: 10.1515/revic-2025-0075.

74. Aceves C., Mendieta I., Anguiano B., Delgado-González E. Molecular Iodine Has Extrathyroidal Effects as an Antioxidant, Differentiator, and Immunomodulator // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – № 3. – 1228. – DOI: 10.3390/ijms22031228.

75. Rokashkov V.D., Spirina L.V., Tarasenko N.V., Chizhevskaya S.Y. Molecular Mechanisms of Radioiodine Refractoriness in Differentiated Thyroid Cancer: Focus on Sodium/Iodide Symporter Dysregulation // Current Issues in Molecular Biology. – 2026. – Т. 48. – № 4. – DOI: 10.3390/cimb48040362.

76. Montes de Oca C., Álvarez L., Aceves C., Anguiano B. Molecular Iodine Induces Anti- and Pro-Neoplastic Effects in Prostate Cancer Models // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – № 16. – 7800. – DOI: 10.3390/ijms26167800.

77. Delgado-González E., Ríos-Arellano E.D.L., Anguiano B., Aceves C. Molecular Iodine Improves the Efficacy and Reduces the Side Effects of Metronomic Cyclophosphamide Treatment against Mammary Cancer Progression // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – № 16. – 8822. – DOI: 10.3390/ijms25168822.

78. Shrivastava A., Tiwari M., Sinha R.A., Kumar A., Balapure A.K., Bajpai V.K., Sharma R., Mitra K., Tandon A., Godbole M.M. Molecular Iodine Induces Caspase-independent Apoptosis in Human Breast Carcinoma Cells Involving the

Mitochondria-mediated Pathway // Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Т. 281. – № 28. – С. 19762–19771. – DOI: 10.1074/jbc.M600746200.

79. Ma X., Lin N., Yang Q., Liu P., Ding H., Xu M., Ren F., Shen Z., Hu K., Meng S., Chen H. Biodegradable copper-iodide clusters modulate mitochondrial function and suppress tumor growth under ultralow-dose X-ray irradiation // Nature Communications. – 2024. – Т. 15. – № 1. – 8092. – DOI: 10.1038/s41467-024-52278-6.

80. Huang L., Szewczyk G., Sarna T., Hamblin M. R. Potassium Iodide Potentiates Broad-Spectrum Antimicrobial Photodynamic Inactivation Using Photofrin // ACS infectious diseases. – 2017. – Т. 3. – № 4. – С. 320–328. – DOI: 10.1021/acsinfecdis.7b00004.

81. Luther G.W. Review on the physical chemistry of iodine transformations in the oceans // Frontiers in Marine Science. – 2023. – Т. 10. – DOI: 10.3389/fmars.2023.1085618.

82. Küpper F.C., Carpenter L.J., Leblanc C., Toyama C., Uchida Y., Maskrey B.H., Robinson J., Verhaeghe E.F., Malin G., Luther G.W., Kroneck P.M.H., Kloareg B., Meyer-Klaucke W., Muramatsu Y., Megson I.L., Potin P., Feiters M.C. *In vivo* speciation studies and antioxidant properties of bromine in Laminaria digitata reinforce the significance of iodine accumulation for kelps // Journal of Experimental Botany. – 2013. – Т. 64. – № 10. – С. 2653–2664. – DOI: 10.1093/jxb/ert110.

83. Cuenca-Micó O., Aceves C. Micronutrients and Breast Cancer Progression: A Systematic Review // Nutrients. 2020. Т. 12, № 12. С. 3613 – DOI: 10.3390/nu12123613.

84. Rohde K.H., Sorci L. The Prospective Synergy of Antitubercular Drugs with NAD Biosynthesis Inhibitors // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Т. 11. – 634640. – DOI: 10.3389/fmicb.2020.634640.

85. Unissa A.N., Subbian S., Hanna L.E., Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis // Infection, Genetics and Evolution. – 2016. – Т. 45. – С. 474–492. – DOI: 10.1016/j.meegid.2016.09.004.

86. Tyagi S., Gupta P., Saini A.S., Kaushal C., Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases // Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research. – 2011. – Т. 2. – № 4. – С. 236–240. – DOI: 10.4103/2231-4040.90879.

87. Changizi Z., Kajbaf F., Moslehi A. An Overview of the Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptors in Liver Diseases // Journal of Clinical and Translational Hepatology. – 2023. – Т. 11. – № 7. – С. 1542–1552. – DOI: 10.14218/JCTH.2023.00334.

88. Janani C., Ranjitha Kumari B. D. PPAR gamma gene--a review // Diabetes & Metabolic Syndrome. – 2015. – Т. 9. – № 1. – С. 46–50. – DOI: 10.1016/j.dsx.2014.09.015.

89. Nava-Villalba M., Aceves C. 6-Iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine // Prostaglandins & Other Lipid Mediators. – 2014. – Т. 112. – С. 27–33. – DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2014.07.001.

90. Gärtner R., Rank P., Ander B. The role of iodine and delta-iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells // Hormones. – 2010. – T. 9. – № 1. – C. 60–66. – DOI: 10.14310/horm.2002.1254.

91. Thomasz L., Oglio R., Salvarredi L., Perona M., Rossich L., Copelli S., Pisarev M., Juvenal G. Regulation of NADPH oxidase NOX4 by delta iodolactone (IL-δ) in thyroid cancer cells // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2018. – T. 470. – C. 115–126. – DOI: 10.1016/j.mce.2017.10.004.

92. Dang H., Sheng J., Tang P., Peng X., Zhang R., Zhao X., Hu J., Xu T. The role and mechanism of NADPH oxidase in the development and progression of thyroid carcinoma // American Journal of Cancer Research. – 2023. – T. 13. – № 9. – C. 4366–4375.

93. Konaklieva M.I., Plotkin B.J. Lactones: generic inhibitors of enzymes? // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. – 2005. – T. 5. – № 1. – C. 73–95. – DOI: 10.2174/1389557053402828.

94. Sladek F.M. What are nuclear receptor ligands? // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2011. – T. 334. – № 1-2. – C. 3–13. – DOI: 10.1016/j.mce.2010.06.018.

95. Langer R., Burzler C., Bechtner G., Gärtner R. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles // Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association. – 2003. – T. 111. – № 6. – C. 325–329. – DOI: 10.1055/s-2003-42721.

96. Nuñez-Anita R.E., Arroyo-Helguera O., Cajero-Juárez M., López-Bojorquez L., Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer // Prostaglandins & Other Lipid Mediators. – 2009. – T. 89. – № 1-2. – C. 34–42. – DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2009.04.001.

97. Tachibana K., Yamasaki D., Ishimoto K., Doi T. The Role of PPARs in Cancer // PPAR Research. – 2008. – T. 2008. – 102737. – DOI: 10.1155/2008/102737.

98. Sajeev A., BharathwajChetty B., Manickasamy M. K., Alqahtani M. S., Abbas M., Shakibaei M., Sethi G., Ma Z., Kunnumakkara A. B. Nuclear receptors in ovarian cancer: changing paradigms in cancer therapeutics // Frontiers in Oncology. – 2024. – T. 14. – 1383939. – DOI: 10.3389/fonc.2024.1383939.

99. Dias R.B., Araújo T.B.S., Freitas R.D., Rodrigues A.C.B.D.C., Sousa L.P., Sales C.B.S., Valverde L.D.F., Soares M.B.P., Dos Reis M.G., Coletta R.D., Ramos E. A.G., Camara C.A., Silva T.M.S., Filho J.M.B., Bezerra D.P., Rocha C.A.G. β-Lapachone and its iodine derivatives cause cell cycle arrest at G2/M phase and reactive oxygen species-mediated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells // Free Radical Biology & Medicine. – 2018. – T. 126. – C. 87–100. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.022.

100. Ramos T.D.C.F., Dias R.B., Santos L.D.S., Valverde L.D.F., Nogueira R. L.R., Bastos I.N., Coletta R. D., Soares M. B. P., Souza B.S.D.F., Dos Santos J N., Dos Reis M.G., Bezerra D.P., Gurgel C.A. Curcumin triggers reactive oxygen species-

mediated apoptosis and suppresses tumor growth in metastatic oral squamous cell carcinoma // Frontiers in Oncology. – 2025. – Т. 15. – 1668271. – DOI: 10.3389/fonc.2025.1668271.

101. Boros E., Dyson P.J., Gasser G. Classification of Metal-based Drugs According to Their Mechanisms of Action // Chem. – 2020. – Т. 6. – № 1. – С. 41–60. – DOI: 10.1016/j.chempr.2019.10.013.

102. Калыкова А.С., Баринов Д.В., Сакипова З.Б. Этапы разработки новых лекарственных средств на основе оригинальной субстанции ФС-1 // Вестник КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова. Материалы научно-практической конференции по итогам научно-технических программ. – 2012. – Т. №4. – С. 78–81.

103. Yuldasheva G., Zhidomirov G., Ilin A. Effect of α-dextrin nanoparticles on the structure of iodine complexes with polypeptides and alkali metal halogenides, and on the mechanisms of their anti-human immunodeficiency virus and anticancer activity. // Design and Development of New Nanocarriers. – William Andrew Publishing. – 2018. – С. 637–685. – DOI: 10.1016/B978-0-12-813627-0.00017-X.

104. Разработка лекарственных средств на основе аддуктов иода и их применение в медицине [Электронный ресурс]. – 2026. – URL: https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-lekarstvennyh-sredstv-na-osnove-adduktov-ioda-i-ih-primenenie-v-meditsine/viewer (дата обращения: 12.04.2026).

105. Benesi H.A., Hildebrand J.H.A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons // Journal of the American Chemical Society. – 1949. – Т. 71. – № 8. – С. 2703–2707. – DOI: 10.1021/ja01176a030.

106. Hasani M., Rezaei A. Spectrophotometric study of the charge-transfer complexes of iodine with antipyrine in organic solvents // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2006. – Т. 65. – № 5. – С. 1093–1097. – DOI: 10.1016/j.saa.2006.02.009.

107. De Caro C., Claudia H. UV/Vis Spectrophotometry - Fundamentals and Applications. – 2025.

108. Kertesz M., Vonderviszt F. Electronic structure of long polyiodide chains // Journal of the American Chemical Society. – 1982. – Т. 104. – № 22. – С. 5889–5893. – DOI: 10.1021/ja00386a007.

109. Svensson P.H., Kloo L. Synthesis, Structure, and Bonding in Polyiodide and Metal Iodide−Iodine Systems // Chemical Reviews. – 2003. – Т. 103. – № 5. – С. 1649–1684. – DOI: 10.1021/cr0204101.

110. Kaiho T. Inorganic Iodides. // Iodine Chemistry and Applications. – John Wiley & Sons, Ltd. – 2014. – С. 55–73. – DOI: 10.1002/9781118909911.ch5.

111. Lauterbach A., Uber G. Iodine and Iodine Compounds. // Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. – John Wiley & Sons, Ltd. – 2011. – С. 1–28. – DOI: 10.1002/0471238961.0915040912012120.a01.pub3.

112. Küpper F.C., Feiters M.C., Olofsson B., Kaiho T., Yanagida S., Zimmermann M.B., Carpenter L.J., Luther III G.W., Lu Z., Jonsson M., Kloo L. Commemorating Two Centuries of Iodine Research: An Interdisciplinary Overview of

Current Research // Angewandte Chemie International Edition. – 2011. – Т. 50. – № 49. – С. 11598–11620. – DOI: 10.1002/anie.201100028.

113. Kanagalingam J., Feliciano R., Hah J.H., Labib H., Le T.A., Lin J. Practical use of povidone-iodine antiseptic in the maintenance of oral health and in the prevention and treatment of common oropharyngeal infections // International Journal of Clinical Practice. – 2015. – Т. 69. – № 11. – С. 1247–1256. – DOI: 10.1111/ijcp.12707.

114. Chopra A., Sivaraman K., Radhakrishnan R., Balakrishnan D., Narayana A. Can povidone iodine gargle/mouthrinse inactivate SARS-CoV-2 and decrease the risk of nosocomial and community transmission during the COVID-19 pandemic? An evidence-based update // The Japanese Dental Science Review. – 2021. – Т. 57. – С. 39–45. – DOI: 10.1016/j.jdsr.2021.03.001.

115. Sularz O., Koronowicz A., Boycott C., Smoleń S., Stefanska B. Molecular Effects of Iodine-Biofortified Lettuce in Human Gastrointestinal Cancer Cells // Nutrients. – 2022. – Т. 14. – № 20. – 4287. – DOI: 10.3390/nu14204287.

116. Bigliardi P.L., Alsagoff S.A.L., El-Kafrawi H.Y., Pyon J.K., Wa C.T.C., Villa M.A. Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices // International Journal of Surgery. – 2017. – Т. 44. – С. 260–268. – DOI: 10.1016/j.ijsu.2017.06.073.

117. Schenck H.U., Simak P., Haedicke E. Structure of polyvinylpyrrolidone-iodine (povidone-iodine) // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1979. – Т. 68. – № 12. – С. 1505–1509. – DOI: 10.1002/jps.2600681211.

118. Goodwin M., Steed B., Yufit D., Musa O., Berry D., Steed J. Halogen and Hydrogen Bonding in Povidone-Iodine and Related Co-Phases // Crystal Growth & Design. – 2017. – Т. 17. – DOI: 10.1021/acs.cgd.7b01103.

119. Carlin R.L. Inorganic electronic spectroscopy (Lever, A. B. P.) // Journal of Chemical Education. – 1969. – Т. 46. – № 9. – С. A628. – DOI: 10.1021/ed046pA628.1.

120. Turganbay S., Ilin A., Korotetskiy I., Jumagaziyeva A., Kenesheva S., Akhmetova G., Reva O. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial activity of iodine-containing coordination compounds // BMC Research Notes. – 2024. – Т. 17. – Art. 374. – DOI: 10.1186/s13104-024-07052-8.

121. Zeng J.J., Wang Z.X., Wu F.G. Iodine-containing materials for biomedical applications // Journal of Materials Chemistry B. – 2025. – Т. 13. – № 29. – P. 8583–8597. – DOI: 10.1039/D5TB00534E.

122. Burks R.I. Povidone-iodine solution in wound treatment // Physical Therapy. – 1998. – Т. 78. – № 2. – С. 212–218. – DOI: 10.1093/ptj/78.2.212.

123. Kariya A., Yamaguchi T., Nobuta T., Tada N., Miura T., Itoh A. Molecular-iodine-catalyzed aerobic oxidative synthesis of β-hydroxy sulfones from alkenes // RSC Advances. – 2014. – Т. 4. – № 25. – С. 13191–13194. – DOI: 10.1039/C3RA47863G.

124. Yamamoto T., Hishinuma M., Yamamoto A. Lithium-Iodine Solid Electrolyte Galvanic Cells Using Iodine Adducts of Nylon-6 as Active Materials of Positive Electrodes // Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial

Electrochemistry. – 1985. – Т. 185. – № 2. – С. 273–284. – DOI: 10.1016/0368-1874(85)80135-0.

125. Giovanella L., Avram A.M., Petranović Ovčariček P., Clerc J. Thyroid Functional and Molecular Imaging // La Presse Médicale. – 2022. – Т. 51. – № 2. – Art. 104116. – DOI: 10.1016/j.lpm.2022.104116.

126. Yoshimura A., Yusubov M.S., Zhdankin V.V. Synthetic applications of pseudocyclic hypervalent iodine compounds // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2016. – Т. 14. – № 21. – С. 4771–4781. – DOI: 10.1039/C6OB00773B.

127. Singh F.V., Shetgaonkar S.E., Krishnan M., Wirth T. Progress in organocatalysis with hypervalent iodine catalysts // Chemical Society Reviews. – 2022. – Т. 51. – № 18. – С. 8102–8139. – DOI: 10.1039/D2CS00206J.

128. Ghosh H., Patel B. Hypervalent iodine(III)-mediated oxidation of aldoximes to N-acetoxy or N-hydroxy amides // Organic & biomolecular chemistry. – 2010. – Т. 8. – С. 384–90. – DOI: 10.1039/b917096k.

129. Roy G., Nethaji M., Mugesh G. Interaction of anti-thyroid drugs with iodine: the isolation of two unusual ionic compounds derived from Se-methimazole // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2006. – Т. 4. – № 15. – С. 2883–2887. – DOI: 10.1039/b604060h.

130. Ильин А.И., Кулаков И.В., Щукина О.В., Баринов Д.В. Перспективность поиска и синтеза новых противоинфекционных соединений среди новых полифункциональных галогенсодержащих N гликозиламинов // III-международная научная конференция молодых ученых «Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане». – 2009. – С. 6.

131. Люблинский С.Л., Савчик С.А., Смирнов С.В. Средство для профилактики йоддефицитных состояний организма: пат. RU2211048C1. – 2003. – URL: https://patents.google.com/patent/RU2211048C1/ru (дата обращения: 12.04.2026).

132. Жамсаранова С.Д., Лыгденов Д.В., Сордонова Е.В. Способ получения средства для профилактики йоддефицитных состояний и иммунодефицитов: пат. RU2720200C2. – 2020. – URL: https://patents.google.com/patent/RU2720200C2/ru (дата обращения: 12.04.2026).

133. Цыб А.Ф., Розиев Р.А., Скворцов В.Г., Клепов А.Н., Скобелев И.В., Ус П.П., Кузин В.В., Гончарова А.Я., Бозаджиев Л.Л., Григорьев А.Н. Средство для регулирования йодного обмена или профилактики йоддефицитных состояний: пат. RU2151611C1. – 2000. – URL: https://patents.google.com/patent/RU2151611C1/ru (дата обращения: 12.04.2026).

134. Георг-Вильгельм Л., Отто Э., Вильгельм П., Карл-Гейнц Б., Грэхэм Х. Микробицидное средство, способ получения микробицидного препарата и способ борьбы с микробами: пат. RU2095982C1. – 1997. – URL: https://patents.google.com/patent/RU2095982C1/ja (дата обращения: 12.04.2026).

135. Цай Ю. Физический способ борьбы с микроорганизмами: пат. RU2657532C2. – 2018. – URL: https://patents.google.com/patent/RU2657532C2/ru (дата обращения: 12.04.2026).

136. Li L., Zhou H., Gai F., Chi X., Zhao Y., Zhang F., Zhao (Kent) Z. Synthesis of quaternary phosphonium N-chloramine biocides for antimicrobial applications // RSC Advances. – 2017. – Т. 7. – № 22. – С. 13244–13249. – DOI: 10.1039/C6RA24954J.

137. Makhayeva D.N., Irmukhametova G.S., Khutoryanskiy V.V. Advances in Antimicrobial Polymeric Iodophors // European Polymer Journal. – 2023. – Т. 201. – 112573. – DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2023.112573.

138. Navikaite-Snipaitiene V., Danilovas P.P., Klimaviciute R., Bendoraitiene J. The stability of water-soluble modified starch iodophors // Chemical Technology. – 2013. – Т. 63. – DOI: 10.5755/j01.ct.63.1.4519.

139. Glick P.L., Guglielmo B.J., Tranbaugh R.F., Turley K. Iodine toxicity in a patient treated by continuous povidone-iodine mediastinal irrigation // The Annals of Thoracic Surgery. – 1985. – Т. 39. – № 5. – С. 478–480. – DOI: 10.1016/s0003-4975(10)61965-0.

140. Qureshi Z.A., Hittle L.E., O'Hara J.A., Rivera J.I., Syed A., Shields R.K., Pasculle A.W., Ernst R.K., Doi Y. Colistin-resistant Acinetobacter baumannii: beyond carbapenem resistance // Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. – 2015. – Т. 60. – № 9. – С. 1295–1303. – DOI: 10.1093/cid/civ048.

141. Ahmed S.K., Hussein S., Qurbani K., Ibrahim R.H., Fareeq A., Mahmood K. A., Mohamed M.G. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects // Journal of Medicine, Surgery, and Public Health. – 2024. – Т. 2. – 100081. – DOI: 10.1016/j.glmedi.2024.100081.

142. Zubko E.I., Zubko M.K. Co-operative inhibitory effects of hydrogen peroxide and iodine against bacterial and yeast species // BMC Research Notes. – 2013. – Т. 6. – С. 272. – DOI: 10.1186/1756-0500-6-272.

143. Cooper R.A. Iodine revisited // International Wound Journal. – 2007. – Т. 4. – № 2. – С. 124–137. – DOI: 10.1111/j.1742-481X.2007.00314.x.

144. Gottardi W., Debabov D., Nagl M. N-chloramines, a promising class of well-tolerated topical anti-infectives // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2013. – Т. 57. – № 3. – С. 1107–1114. – DOI: 10.1128/AAC.02132-12.

145. Reimer K., Wichelhaus T.A., Schäfer V., Rudolph P., Kramer A., Wutzler P., Ganzer D., Fleischer W. Antimicrobial effectiveness of povidone-iodine and consequences for new application areas // Dermatology. – 2002. – Т. 204 Suppl 1. – С. 114–120. – DOI: 10.1159/000057738.

146. Tessema B., Frank S., Bidra A. SARS-CoV-2 Viral Inactivation Using Low Dose Povidone-Iodine Oral Rinse-Immediate Application for the Prosthodontic Practice // Journal of Prosthodontics: Official Journal of the American College of Prosthodontists. – 2020. – Т. 29. – № 6. – С. 459. – DOI: 10.1111/jopr.13207.

147. Noda Y., Fujii K., Fujii S. Critical evaluation of cadexomer-iodine ointment and povidone-iodine sugar ointment // International Journal of Pharmaceutics. – 2009. – Т. 372. – № 1-2. – С. 85–90. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.01.007.

148. Ohtani T., Mizuashi M., Ito Y., Aiba S. Cadexomer as well as cadexomer iodine induces the production of proinflammatory cytokines and vascular endothelial

growth factor by human macrophages // Experimental Dermatology. – 2007. – Т. 16. – № 4. – С. 318–323. – DOI: 10.1111/j.1600-0625.2006.00532.x.

149. Marquardt C., Matuschek E., Bölke E., Gerber P. A., Peiper M., V Seydlitz-Kurzbach J., Buhren B. A., Griensven M., Budach W., Hassan M., Kukova G., Mota R., Höfer D., Orth K., Fleischmann W. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM) // European Journal of Medical Research. – 2010. – Т. 15. – № 5. – С. 204–209. – DOI: 10.1186/2047-783x-15-5-204.

150. Iodine and Inorganic Iodines: Human Health Aspects. – World Health Organization. – 2012. – URL: https://www.who.int/publications/b/31165 (дата обращения: 12.04.2026).

151. Winder M., Kosztyła Z., Boral A., Kocełak P., Chudek J. The Impact of Iodine Concentration Disorders on Health and Cancer // Nutrients. – 2022. – Т. 14. – № 11. – Art. 2209. – DOI: 10.3390/nu14112209.

152. Ilin A.I., Kulmanov M.E., Korotetskiy I.S., Islamov R.A., Akhmetova G.K., Lankina M.V., Reva O.N. Genomic Insight into Mechanisms of Reversion of Antibiotic Resistance in Multidrug Resistant Mycobacterium Tuberculosis Induced by a Nanomolecular Iodine-Containing Complex FS-1 // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2017. – Т. 7. – DOI: 10.3389/fcimb.2017.00151.

153. Yuldasheva G. The Antitumor Activity of Molecular Iodine Complexes with Lithium Halogenides and Bioorganic Ligands when Applied in Combination with Doxorubicin // Journal of Antivirals & Antiretrovirals. – 2014. – Т. 06. – DOI: 10.4172/jaa.1000096.

154. Yuldasheva G., Zhidomirov G., Leszczynski J., Ilin A. Iodine Containing Drugs: Complexes of Molecular Iodine and Tri-iodide with Bioorganic Ligands and Lithium Halogenides in Aqueous Solutions. // Practical Aspects of Computational Chemistry IV. – 2016. – С. 279–301. – DOI: 10.1007/978-1-4899-7699-4_10.

155. Yuldasheva G., Zhidomirov G., Abekova A., Ilin A. The Mechanism of Anti-Cancer Activity of Complexes of Molecular Iodine with α-Dextrins and Polypeptides and Lithium Halogenides // Journal of Antivirals & Antiretrovirals. – 2016. – Т. 8. – № 2. – С. 72–78. – DOI: 10.4172/jaa.1000138.

156. Yuldasheva G.A., Zhidomirov G.M., Ilin A.I. Effect of organic ligands with conjugated π-bonds on the structure of iodine-α-dextrin complexes // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2012. – Т. 59. – № 1. – С. 29–34. – DOI: 10.1002/bab.70.

157. Yuldasheva G.A., Zhidomirov G.M., Ilin A.I. A quantum-chemical model of the inhibition mechanismof viral DNA HIV-1 replication by Iodine complexcompounds // Natural Science. – 2011. – Т. 3. – № 7. – С. 573–579. – DOI: 10.4236/ns.2011.37080.

158. Babalska Z.Ł., Korbecka-Paczkowska M., Karpiński T.M. Wound Antiseptics and European Guidelines for Antiseptic Application in Wound Treatment // Pharmaceuticals. – 2021. – Т. 14. – № 12. – 1253. – DOI: 10.3390/ph14121253.

159. Vergara D., Loza-Rodríguez N., Acevedo F., Bustamante M., López O. Povidone-iodine loaded bigels: Characterization and effect as a hand antiseptic agent

// Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2022. – Т. 72. – 103427. – DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103427.

160. Li J., Sun D., Wu J., Liu F., Xu Y., Wang Y., Shui X., Li Q., Zhao B. Lithium enhanced plasmid-mediated conjugative transfer of antimicrobial resistance genes in Escherichia coli: Different concentrations and mechanisms // Aquatic Toxicology. – 2025. – Т. 279. – 107263. – DOI: 10.1016/j.aquatox.2025.107263.

161. Chernova A., Pukhniarskaia D., Biryukov M., Plotnikov E. Influence of Lithium Salt on Escherichia coli Growth and Viability // Industrial Biotechnology. – 2022. – Т. 18. – № 1. – С. 32–37. – DOI: 10.1089/ind.2021.0006.

162. Vaidya M.Y., McBain A.J., Butler J.A., Banks C.E., Whitehead K.A. Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against Enterococcus faecium, Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii in Planktonic and Biofilm Phenotypes // Scientific Reports. – 2017. – Т. 7. – № 1. – 5911. – DOI: 10.1038/s41598-017-05976-9.

163. Plotnikov E., Pukhnyarskaya D., Chernova A. Lithium and Microorganisms: Biological Effects and Mechanisms // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2023. – Т. 24. – № 13. – С. 1623–1629. – DOI: 10.2174/1389201024666230302153849.

164. Shepilov D., Turganbay S., Jumagaziyeva A., Bukeyeva T., Askarova D., Bolatova D., Doszhanov Y., Zhumazhanov A., Kerimkulova A., Saurykova K., Sabitov A. The Iodine-Dextrin-Lithium Complex: Morphology, Antibacterial Activity, and Cytotoxicity // Molecules. – 2025. – Т. 30. – № 24. – 4822. – DOI: 10.3390/molecules30244822.

165. Pedotti S., Ferreri L., Migliore R., Leotta C. G., Pitari G. M., D'Antona N., Petralia S., Aleo D., Sgarlata C., Consoli G. M. L. A novel cationic β-cyclodextrin decorated with a choline-like pendant exhibits Iodophor, Mucoadhesive and bactericidal properties // Carbohydrate Polymers. – 2024. – Т. 328. – 121698. – DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121698.

166. Hu Y., Yu B., Wang L., McClements D. J., Li C. Study of dextrin addition on the formation and physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsion: Effect of dextrin molecular dimension // Food Hydrocolloids. – 2022. – Т. 128. – 107569. – DOI: 10.1016/j.foodhyd.2022.107569.

167. Zisi A.P., Exindari M.K., Siska E.K., Koliakos G.G. Iodine-lithium-alpha-dextrin (ILαD) against Staphylococcus aureus skin infections: a comparative study of in-vitro bactericidal activity and cytotoxicity between ILαD and povidone-iodine // The Journal of Hospital Infection. – 2018. – Т. 98. – № 2. – С. 134–140. – DOI: 10.1016/j.jhin.2017.07.013.

168. Abekova A., Kenzhebekova R., Jumagaziyeva A., Turganbay S., Ilin A., Ossikbayeva S., Kydyrbekova A., Islamov R. Comparative Antitumor and Mechanistic Effects of the Iodine–Lithium Complex KC-144 in Cisplatin-Sensitive, Cisplatin-Resistant and Non-Malignant Mesothelial Cells // Engineered Science. – 2026. – Т. 39. – № 2033.– DOI: 10.30919/es2033.

169. Turganbay S., Ilin A., Sabitov A., Askarova D., Jumagaziyeva A., Iskakbayeva Z., Seisembekova A., Bukeyeva T., Azembayev A. Dextrin/PVA/Iodine

Complexes: Preparation, Characterization, and Antibacterial, Cytotoxic Activity // Engineered Science. – 2025. – DOI: 10.30919/es1595.

170. Абенова М.Т., Тайлаков Б.Б. Цитологические исследования повреждения опухолевых клеток аффинитетной асцитной опухоли яичника крыс (АфОЯ) при сочетанном действии цитостатиков. // Journal of Clinical Medicine of Kazakhstan, – 2011. – Т. 21, – № 2.

171. OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. – OECD. – 2020. – DOI: 10.1787/9789264071247-en.

172. Yuldasheva G.A., Zhidomirov G.M., Leszczynski J., Ilin A.I. The effect of the amphoteric properties of amino acids in the zwitterionic form on the structure of iodine complex compounds in aqueous solutions // Journal of Molecular Structure. – 2013. – Т. 1033. – С. 321–330. – DOI: 10.1016/j.molstruc.2012.10.031.

173. Ilin A., Kulmanov M. Antibacterial Agent for Treating Infectious Diseases of Bacterial Origin: пат. 024595. – Евразийское патентное ведомство.

174. ГОСТ 4159-79. Реагенты. Йод. Технические условия. – Издательство стандартов. – 1979.

175. Государственная фармакопея Республики Казахстан. – в 2 т. Т. 1. – Министерство здравоохранения Республики Казахстан. – 2008.

176. Европейская фармакопея. – 2011.

177. Kireev S.V., Shnyrev S.L. Study of molecular iodine, iodate ions, iodide ions, and triiodide ions solutions absorption in the UV and visible light spectral bands // Laser Physics. – 2015. – Т. 25. – № 7. – 075602. – DOI: 10.1088/1054-660X/25/7/075602.

178. European Pharmacopoeia - MCHIP. – 8 ed. – Council of Europe: Strasbourg, France. – 2013.

179. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability // Current Protocols in Immunology. – 2015. – Т. 111. – № 1. – DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs111.

180. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of Immunological Methods. – 1983. – Т. 65. – № 1-2. – С. 55–63. – DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

181. Chou T.C., Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors // Advances in Enzyme Regulation. – 1984. – Т. 22. – С. 27–55. – DOI: 10.1016/0065-2571(84)90007-4.

182. Абекова А., Володина Г., Исламов Р., Абрамова Ж., Кенжебекова Р., Ильин А. Особенности определения цитотоксичности координационного соединения иода *in vitro*. // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия биологическая и медицинская, – 2017. – Т. 3, – № 321. – С. 141–145.

183. Franken N.A.P., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., Van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro* // Nature Protocols. – 2006. – Т. 1. – № 5. – С. 2315–2319. – DOI: 10.1038/nprot.2006.339.

184. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. // The Journal of cell biology. – 1975. – Т. 66. – № 1. – С. 188–193. – DOI: 10.1083/jcb.66.1.188.

185. Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay // Methods. – 2008. – Т. 44. – № 3. – С. 250–254. – DOI: 10.1016/j.ymeth.2007.11.008.

186. Johnson L.V., Walsh M.L., Chen L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1980. – Т. 77. – № 2. – С. 990–994. – DOI: 10.1073/pnas.77.2.990.

187. OECD. Test No. 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. – OECD. – 2023. – DOI: 10.1787/9789264264861-en.

188. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay // Nature Protocols. – 2007. – Т. 2. – № 5. – С. 1084–1104. – DOI: 10.1038/nprot.2007.77.

189. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Т. 227. – № 5259. – С. 680–685. – DOI: 10.1038/227680a0.

190. Хабриев Р. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – 2 перераб. и доп. М.: Медицина ed. – 2005.

191. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance. – 2010. – URL: http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj (дата обращения: 18.08.2026).

192. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. – OECD. – 2001 – DOI: 10.1787/9789264071001-en.

193. Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018–2020 гг.: отчет о научно-исследовательской работе за 2019 год (промежуточный) / АО «Научный центр противоинфекционных препаратов»; рук. А.И. Ильин. – Алматы, 2019. – Шифр НТП О.0777. – № государственной регистрации 0118РК00003; инв. № 0219РК01201.

194. Об утверждении надлежащих фармацевтических практик. – Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан № ҚР ДСМ-15. – 2021.

195. Миронов А.Н., и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. ФГБУ «НЦЭСМП» – Минздрава России, – 2012.

196. Абекова А., Исламов Р., Юлдашева Г., Ильин А. Координационное соединение дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид обладающее противоопухолевым действием: пат. №35927. – Министерство Юстиции РК. – 2022.

197. Kireeva G.S., Belyaeva O.A., Senchik K.Y., Bespalov V.G., Stukov A.N., Gubareva E.A., Maydin M.A. Ascitic ovarian cancer is an adequate preclinical model of carcinomatosis to study intraperitoneal chemoperfusion treatment // Siberian journal of oncology. – 2019. – Т. 18. – № 1. – С. 71–78. – DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-71-78.

198. Насырова Е., Долгова Д., Абакумова Т., Антонеева И., Генинг С., Генинг Т. Редокс-статус эритроцитов периферической крови при экспериментальном раке яичников на фоне аутогемохимиотерапии цисплатином и доксорубицином // Ульяновский медико-биологический журнал. – № 1, – 2016. – № УДК 615.032-577.29. – С. 111–117. – URL: https://cyberleninka.ru/article/n/redoks-status-eritrotsitov-perifericheskoy-krovi-pri-eksperimentalnom-rake-yaichnikov-na-fone-autogemohimioterapii-tsisplatinom-i.

199. Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018–2020 гг.: отчет о научно-исследовательской работе за 2018 год (промежуточный) / АО «Научный центр противоинфекционных препаратов»; рук. А.И. Ильин. – Алматы, 2018. – Шифр НТП О.0777. – № государственной регистрации 0118РК00003; инв. № 0218РК01033.

200. Yuldasheva G.A., Kurmanaliyeva A., Ilin A. Structure of the Active Nanocomplex of Antiviral and Anti-Infectious Iodine-Containing Drug FS-1 // Quantum Reports. – 2021. – Т. 3. – № 4. – С. 746–812. – DOI: 10.3390/quantum3040047.

201. Wieske L. H. E., Erdelyi M. Halogen Bonds of Halogen(I) Ions─Where Are We and Where to Go? // Journal of the American Chemical Society. – 2024. – Т. 146. – № 1. – С. 3–18. – DOI: 10.1021/jacs.3c11449.

202. Wei Y., Liu C., Mo L. Ultraviolet absorption spectra of iodine, iodide ion and triiodide ion. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi, 2005. № 1. С. 86–88.

203. Stepin B.D., Stepina S.B. Polyiodo-iodates Containing Five or More Iodine Atoms // Russian Chemical Reviews. – 1986. – Т. 55. – № 9. – С. 812–824. – DOI: 10.1070/RC1986v055n09ABEH003224.

204. Xiaochun Y., Rajai A. H. The complex of xylan and iodine: the induction and detection of nanoscale order // Carbohydrate Research. – 2005. – Т. 340. – № 5. – С. 981–988. – DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.029.

205. Мударисова Р.Х., Ершова Н.Р., Кулиш Е.И., Колесов С.В. Образование фиолетового комплекса при взаимодействии хитозана с йодом. // Вестник Башкирского университета, – 2010. – № 3. – С. 585–586.

206. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии. Л.: Химия, 1985. С. 248.

207. Киреев С.В., Симановский И.Г., Шнырёв С.Л. Исследование поглощения растворов молекулярного йода IO 3-, I-, I 3-в УФ и видимом спектральных диапазонах. Научная сессия МИФИ, 2007. Т. 4. С. 49.

208. Brammer L., Bruton E.A., Sherwood P. Understanding the Behavior of Halogens as Hydrogen Bond Acceptors // Crystal Growth & Design. – 2001. – Т. 1. – № 4. – С. 277–290. – DOI: 10.1021/cg015522k.

209. Mahmoud K., Refat M. S., Sharshar T., Adam A. M. A., Manaaa E. S. A. Synthesis of amino acid iodine charge transfer complexes in situ methanolic medium: Chemical and physical investigations // Journal of Molecular Liquids. – 2016. – Т. 222. – С. 1061–1067. – DOI: 10.1016/j.molliq.2016.07.138.

210. Padhiyar A., Patel A.J., Oza A.T. Spectroscopy of charge transfer complexes of four amino acids as organic two-dimensional conductors // Journal of Physics:

Condensed Matter. – 2007. – Т. 19. – № 48. – 486214. – DOI: 10.1088/0953-8984/19/48/486214.

211. Gegel N.O., Babicheva T.S., Belyakova O.A., Lugovitskaya T.N., Shipovskaya A.B. Spectroscopic analysis of the powdery complex chitosan-iodine. – Saratov, Russian Federation: SPIE. – 2018. – С. 101. – DOI: 10.1117/12.2315067.

212. Мударисова Р., Бадыкова Л., Новоселов И. Взаимодействие арабиногалактана, модифицированного салициловой и 4-аминобензойной кислотами, с иодом // Журнал Общей Химии. – 2018. – Т. 88. – № 12. – С. 2057–2062. – DOI: 10.1134/S0044460X18120181.

213. Madhu S., Evans H.A., Doan-Nguyen V.V., Labram J.G., Wu G., Chabinyc M.L., Seshadri R., Wudl F. Infinite Polyiodide Chains in the Pyrroloperylene–Iodine Complex: Insights into the Starch–Iodine and Perylene–Iodine Complexes // Angewandte Chemie International Edition. – 2016. – Т. 55. – № 28. – С. 8032–8035. – DOI: 10.1002/anie.201601585.

214. Wolpert M., Hellwig P. Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500cm−1 // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2006. – Т. 64. – № 4. – С. 987–1001. – DOI: 10.1016/j.saa.2005.08.025.

215. El-Shenawy A.I., Atta A.H., Refat M.S. Studies of Physical and Chemical Compounds Charge Transfer Between Amino Acids and Iodine and its Applications in the Industry of Unconventional Organic Connectors. International Journal of Science and Research (IJSR), 2015. Т. 4, № 4. С. 1281–1287.

216. Pavlovic S., Brandao P. Adsorption of starch, amylose, amylopectin and glucose monomer and their effect on the flotation of hematite and quartz // Minerals Engineering. – 2003. – Т. 16. – № 11. – С. 1117–1122. – DOI: 10.1016/j.mineng.2003.06.011.

217. Torbica A., Pećinar I., Lević S., Belović M., Jovičić M., Stevanović Z. D., Nedović V. Insight in changes in starch and proteins molecular structure of non-wheat cereal flours influenced by roasting and extrusion treatments // Food Hydrocolloids. – 2023. – Т. 140. – 108591. – DOI: 10.1016/j.foodhyd.2023.108591.

218. Talik P., Moskal P., Proniewicz L. M., Wesełucha-Birczyńska A. The Raman spectroscopy approach to the study of Water–Polymer interactions in hydrated hydroxypropyl cellulose (HPC) // Journal of Molecular Structure. – 2020. – Т. 1210. – 128062. – DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.128062.

219. Jayan H., Yin L., Zhou R., Zou X., Guo Z. Future horizons of Raman spectroscopy in food science: Emerging techniques and innovations for enhanced analysis // Food Chemistry. – 2025. – Т. 493. – 145777. – DOI: 10.1016/j.foodchem.2025.145777.

220. Pesek S., Silaghi-Dumitrescu R. The Iodine/Iodide/Starch Supramolecular Complex // Molecules. – 2024. – Т. 29. – № 3. – С. 641. – DOI: 10.3390/molecules29030641.

221. Vigato A.A., Vinther Sørensen H., Wickramanayake A., Thuresson K., George I., Engblom J., Kocherbitov V. Physicochemical and Structural Study of Iodine Loading in Amorphous Degradable Starch Microspheres // Carbohydrate Polymer

Technologies and Applications. – 2026. – Т. 14. – 101115. – DOI: 10.1016/j.carpta.2026.101115.

222. Kalykova A.S. Stability and storage conditions of the new pharmaceutical substance with antibacterial action. // Фармация Казахстана, – 2015. – Т. 6, – № 169. – С. 45–48.

223. ICH Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products. – 2003.

224. Бекешева К.Б., Устенова Г.О., Курманалиева А.Р., Баринов Д.В. Изучение стабильности субстанции на основе аддуктов иода. // Фармация Казахстана, – 2016. – Т. 10, – № 185. – С. 19–25.

225. Fukuda M., Murano H., Yamashiro Y., Takahashi N. Effects of Povidone Iodine on Cultured Corneal Epithelial Cells // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2003. – Т. 44. – № 13. – С. 1366–1366.

226. Noda Y., Kanematsu M., Goshima S., Kondo H., Watanabe H., Kawada H., Kawai N., Tanahashi Y., Miyoshi T. R., Bae K. T. Reducing iodine load in hepatic CT for patients with chronic liver disease with a combination of low-tube-voltage and adaptive statistical iterative reconstruction // European Journal of Radiology. – 2015. – Т. 84. – № 1. – С. 11–18. – DOI: 10.1016/j.ejrad.2014.10.008.

227. Müller G., Hai D., Kramer A. Lack of *in vitro* Genotoxicity of Povidone-Iodine in Solution, in Ointment or in a Liposomal Formulation (Repithel®) // Dermatology. – 2006. – Т. 212. – № Suppl. 1. – С. 94–97. – DOI: 10.1159/000090103.

228. Doan L., Piskoun B., Rosenberg A. D., Blanck T. J., Phillips M. S., Xu F. *In Vitro* Antiseptic Effects on Viability of Neuronal and Schwann Cells // Regional Anesthesia & Pain Medicine. – 2012. – Т. 37. – № 2. – С. 131. – DOI: 10.1097/AAP.0b013e31823cdd96.

229. Steins A., Carroll C., Choong F.J., George A.J., He J.S., Parsons K.M., Feng S., Man S.M., Kam C., Van Loon L.M., Poh P., Ferreira R., Mann G.J., Gruen R.L., Hannan K.M., Hannan R.D., Schulte K.M. Cell death and barrier disruption by clinically used iodine concentrations // Life Science Alliance. – 2023. – Т. 6. – № 6. – e202201875. – DOI: 10.26508/lsa.202201875.

230. Basak D., Arrighi S., Darwiche Y., Deb S. Comparison of Anticancer Drug Toxicities: Paradigm Shift in Adverse Effect Profile // Life. – 2021. – Т. 12. – № 1. – С. 48. – DOI: 10.3390/life12010048.

231. Xiao S., Zhang J., Liu M., Iwahata H., Rogers H.B., Woodruff T.K. Doxorubicin Has Dose-Dependent Toxicity on Mouse Ovarian Follicle Development, Hormone Secretion, and Oocyte Maturation // Toxicological Sciences. – 2017. – Т. 157. – № 2. – С. 320–329. – DOI: 10.1093/toxsci/kfx047.

232. Romani A.M. Cisplatin in cancer treatment // Biochemical Pharmacology. – 2022. – Т. 206. – 115323. – DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115323.

233. McCauley J., Zivanovic A., Skropeta D. Bioassays for Anticancer Activities. // Metabolomics Tools for Natural Product Discovery. – Totowa, NJ: Humana Press. – 2013. – С. 191–205. – DOI: 10.1007/978-1-62703-577-4_14.

234. Hoda M.A., Münzker J., Ghanim B., Schelch K., Klikovits T., Laszlo V., Sahin E., Bedeir A., Lackner A., Dome B., Setinek U., Filipits M., Eisenbauer M.,

Kenessey I., Török S., Garay T., Hegedus B., Catania A., Taghavi S., Klepetko W., Berger W., Grusch M. Suppression of activin A signals inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells // British Journal of Cancer. – 2012. – Т. 107. – № 12. – С. 1978–1986. – DOI: 10.1038/bjc.2012.519.

235. Dasari S., Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action // European Journal of Pharmacology. – 2014. – Т. 740. – С. 364–378. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

236. Takahara P.M., Rosenzweig A.C., Frederick C.A., Lippard S.J. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin // Nature. – 1995. – Т. 377. – № 6550. – С. 649–652. – DOI: 10.1038/377649a0.

237. Van Ravenstein S.X., Mehta K.P., Kavlashvili T., Byl J.A. W., Zhao R., Osheroff N., Cortez D., Dewar J.M. Topoisomerase II poisons inhibit vertebrate DNA replication through distinct mechanisms // The EMBO Journal. – 2022. – Т. 41. – № 12. – С. EMBJ2022110632. – DOI: 10.15252/embj.2022110632.

238. Atwal M., Swan R.L., Rowe C., Lee K. C., Lee D.C., Armstrong L., Cowell I.G., Austin C.A. Intercalating TOP2 Poisons Attenuate Topoisomerase Action at Higher Concentrations // Molecular Pharmacology. – 2019. – Т. 96. – № 4. – С. 475–484. – DOI: 10.1124/mol.119.117259.

239. Arroyo-Helguera O., Anguiano B., Delgado G., Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line // Endocrine-Related Cancer. – 2006. – Т. 13. – № 4. – С. 1147–1158. – DOI: 10.1677/erc.1.01250.

240. Chou T.C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method // Cancer Research. – 2010. – Т. 70. – № 2. – С. 440–446. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.

241. Iijima Y., Bandow K., Sano M., Hino S., Kaneko T., Horie N., Sakagami H. *In Vitro* Assessment of Antitumor Potential and Combination Effect of Classical and Molecular-targeted Anticancer Drugs // Anticancer Research. – 2019. – Т. 39. – № 12. – С. 6673–6684. – DOI: 10.21873/anticanres.13882.

242. Wei Y., To K.K., Au-Yeung S.C. Synergistic cytotoxicity from combination of imatinib and platinum-based anticancer drugs specifically in Bcr-Abl positive leukemia cells // Journal of Pharmacological Sciences. – 2015. – Т. 129. – № 4. – С. 210–215. – DOI: 10.1016/j.jphs.2015.10.008.

243. Ding Y., Niu W., Zhang T., Wang J., Cao J., Chen H., Wang R., An H. Levistolide A synergistically enhances doxorubicin-induced apoptosis of k562/dox cells by decreasing MDR1 expression through the ubiquitin pathway // Oncology Reports. – 2018. – DOI: 10.3892/or.2018.6889.

244. Zambrano-Estrada X., Landaverde-Quiroz B., Dueñas-Bocanegra A.A., De Paz-Campos M.A., Hernández-Alberto G., Solorio-Perusquia B., Trejo-Mandujano M., Pérez-Guerrero L., Delgado-González E., Anguiano B., Aceves C. Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer // BMC Veterinary Research. – 2018. – Т. 14. – № 1. – С. 87. – DOI: 10.1186/s12917-018-1411-6.

245. Zhao J.M. Diluted povidone-iodine inhibits tumor growth through apoptosis-induction and suppression of SOD activity // Oncology Reports. – 2012. – Т. 28. – № 2. – С. 383–388. – DOI: 10.3892/or.2011.1537.

246. Kolypetri P., Carayanniotis G. Apoptosis of NOD.H2h4 Thyrocytes by Low Concentrations of Iodide is Associated with Impaired Control of Oxidative Stress // Thyroid. – 2014. – Т. 24. – № 7. – С. 1170–1178. – DOI: 10.1089/thy.2013.0676.

247. Heymann W.R. Potassium iodide and the Wolff-Chaikoff effect: Relevance for the dermatologist // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2000. – Т. 42. – № 3. – С. 490–492. – DOI: 10.1016/S0190-9622(00)90224-X.

248. Arroyo-Helguera O., Rojas E., Delgado G., Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects // Endocrine Related Cancer. – 2008. – Т. 15. – № 4. – С. 1003–1011. – DOI: 10.1677/ERC-08-0125.

249. Rösner H., Möller W., Groebner S., Torremante P. Antiproliferative/cytotoxic effects of molecular iodine, povidone-iodine and Lugol's solution in different human carcinoma cell lines // Oncology Letters. – 2016. – Т. 12. – № 3. – С. 2159–2162. – DOI: 10.3892/ol.2016.4811.

250. Plumb J. A. Cell Sensitivity Assays: Clonogenic Assay. // Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. – Totowa, NJ: Humana Press. – 2004. – С. 159–164. – URL: https://doi.org/10.1385/1-59259-406-9:159 (дата обращения: 16.04.2026).

251. Brix N., Samaga D., Hennel R., Gehr K., Zitzelsberger H., Lauber K. The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation // Radiation Oncology. – 2020. – Т. 15. – № 1. – С. 248. – DOI: 10.1186/s13014-020-01697-y.

252. Janson V., Johansson A., Grankvist K. Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance // Cell Death & Disease. – 2010. – Т. 1. – № 9. – С. e78-e78. – DOI: 10.1038/cddis.2010.54.

253. Punzi S., Cittaro D., Gatti G., Crupi G., Botrugno O. A., Cartalemi A. A., Gutfreund A., Oneto C., Giansanti V., Battistini C., Santacatterina G., Patruno L., Villanti I., Palumbo M., Laverty D. J., Giannese F., Graudenzi A., Caravagna G., Antoniotti M., Nagel Z., Cavallaro U., Lanfrancone L., Yap T. A., Draetta G., Balaban N., Tonon G. Early tolerance and late persistence as alternative drug responses in cancer // Nature Communications. – 2025. – Т. 16. – № 1. – 1291. – DOI: 10.1038/s41467-024-54728-7.

254. Lu J., Wu L., Wang X., Zhu J., Du J., Shen B. Detection of Mitochondria Membrane Potential to Study CLIC4 Knockdown-induced HN4 Cell Apoptosis *In Vitro* // Journal of Visualized Experiments. – 2018. – № 137. – 56317. – DOI: 10.3791/56317.

255. Abdualmjid R. J., Sergi C. M. Mitochondrial Dysfunction and Induction of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma Cell Lines by Thymoquinone // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – № 23. – 14669. – DOI: 10.3390/ijms232314669.

256. Long H.Y., Huang Q.X., Yu Y.Y., Zhang Z.B., Yao Z.W., Chen H.B., Feng J.W. Dehydrocostus lactone inhibits *in vitro* gastrinoma cancer cell growth through apoptosis induction, sub-G1 cell cycle arrest, DNA damage and loss of mitochondrial membrane potential // Archives of Medical Science. – 2019. – Т. 15. – № 3. – С. 765–773. – DOI: 10.5114/aoms.2018.73128.

257. Roelofs B.A., Ge S.X., Studlack P.E., Polster B.M. Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – Т. 86. – С. 250–258. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.032.

258. Gooz M., Maldonado E.N. Fluorescence microscopy imaging of mitochondrial metabolism in cancer cells // Frontiers in Oncology. – 2023. – Т. 13. – 1152553. – DOI: 10.3389/fonc.2023.1152553.

259. Wang L., Duan Q., Wang T., Ahmed M., Zhang N., Li Y., Li L., Yao X. Mitochondrial Respiratory Chain Inhibitors Involved in ROS Production Induced by Acute High Concentrations of Iodide and the Effects of SOD as a Protective Factor // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2015. – Т. 2015. – С. 1–14. – DOI: 10.1155/2015/217670.

260. Truesdale V.W., Luther G.W. Molecular iodine reduction by natural and model organic substances in seawater // Aquatic Geochemistry. – 1995. – Т. 1. – № 1. – С. 89–104. – DOI: 10.1007/BF01025232.

261. Al Bitar S., Gali-Muhtasib H. The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p21cip1/waf1 in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics // Cancers. – 2019. – Т. 11. – № 10. – 1475. – DOI: 10.3390/cancers11101475.

262. Costa A., Iris Maria Forte, Pentimalli F., Iannuzzi C. A., Alfano L., Capone F., Camerlingo R., Calabrese A., Von Arx C., Benot Dominguez R., Quintiliani M., De Laurentiis M., Morrione A., Giordano A. Pharmacological inhibition of CDK4/6 impairs diffuse pleural mesothelioma 3D spheroid growth and reduces viability of cisplatin-resistant cells // Frontiers in Oncology. – 2024. – Т. 14. – 1418951. – DOI: 10.3389/fonc.2024.1418951.

263. Kirkland D., Aardema M., Henderson L., Müller L. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2005. – Т. 584. – № 1-2. – С. 1–256. – DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.02.004.

264. Luijten M., van Benthem J., Morita T., Corvi R., Escobar P.A., Fujita Y., Hemmerich J., Honarvar N., Kirkland D., Koyama N., et al. Evaluation of the Standard Battery of In Vitro Genotoxicity Tests to Predict *In Vivo* Genotoxicity Through Mathematical Modeling: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 2025. – Т. 66. – Suppl. 2. – С. 17–30. – DOI: 10.1002/em.22640.

265. Ren N., Atyah M., Chen W.Y., Zhou C.H. The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications // Journal of

Translational Medicine. – 2017. – Т. 15. – № 1. – С. 110. – DOI: 10.1186/s12967-017-1218-4.

266. Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test // Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects. – 1983. – Т. 113. – № 3-4. – С. 173–215. – DOI: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.

267. Mortelmans K., Riccio E. S. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with Escherichia coli WP2 // Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2000. – Т. 455. – № 1-2. – С. 61–69. – DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00076-2.

268. Stampone E., Bencivenga D., Barone C., Aulitto A., Verace F., Della Ragione F., Borriello A. High Dosage Lithium Treatment Induces DNA Damage and p57Kip2 Decrease // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – № 3. – Art. 1169. – DOI: 10.3390/ijms21031169.

269. Gribble G.W. Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Review. // Naturally Occurring Organohalogen Compounds. – Cham: Springer Nature Switzerland. – 2023. – С. 1–546. – DOI: 10.1007/978-3-031-26629-4_1.

270. OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. – OECD. – 2016. – DOI: 10.1787/9789264264762-en.

271. Abekova A., Islamov R. ChemoProtective effects of new iodine coordinated compound in benzo[a]pyrene- induced lung cancer in BALB/c mice // BIO Web of Conferences. – 2024. – Т. 100. – 03001. – DOI: 10.1051/bioconf/202410003001.

272. McGee J., San Sebastian J.R., Sofia R. *In vivo* mutagenicity studies with iodinated glycerol azeo // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 1997. – Т. 395. – № 1. – С. 29–36. – DOI: 10.1016/S1383-5718(97)00139-3.

273. Kino K., Morikawa M., Kobayashi T., Kobayashi T., Komori R., Sei Y., Miyazawa H. The oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine by iodine // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2010. – Т. 20. – № 12. – С. 3818–3820. – DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.04.032.

274. Dong H., Qiang Z., Richardson S. D. Formation of Iodinated Disinfection Byproducts (I-DBPs) in Drinking Water: Emerging Concerns and Current Issues // Accounts of Chemical Research. – 2019. – Т. 52. – № 4. – С. 896–905. – DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00641.

275. Lepelletier D., Maillard J. Y., Pozzetto B., Simon A. Povidone Iodine: Properties, Mechanisms of Action, and Role in Infection Control and Staphylococcus aureus Decolonization // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2020. – Т. 64. – № 9. – С. e00682–20. – DOI: 10.1128/AAC.00682-20.

276. Dugrillon A., Bechtner G., Uedelhoven W. M., Weber P. C., Gärtner R. Evidence that an Iodolactone Mediates the Inhibitory Effect of Iodide on Thyroid Cell Proliferation but not on Adenosine 3′,5′-Monophosphate Formation // Endocrinology. – 1990. – Т. 127. – № 1. – С. 337–343. – DOI: 10.1210/endo-127-1-337.

277. Zhang L., Sharma S., Zhu L. X. Nonradioactive Iodide Effectively Induces Apoptosis in Genetically Modified Lung Cancer Cells. // Cancer Research, – 2003. – Т. 63, – № 16. – С. 5065–5072.

278. Huang Q., Lee G.Y., Li J., Wang C., Zhao R.L., Deng Z., Houk K.N., Zhao Y. L. Origin of iodine preferential attack at sulfur in phosphorothioate and subsequent P-O or P-S bond dissociation // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2022. – Т. 119. – № 17. – e2119032119. – DOI: 10.1073/pnas.2119032119.

279. Sun Y., Kong L., Wu G., Cao B., Pang X., Deng Z., Dedon P. C., Zhang C., You D. DNA Phosphorothioate Modifications Are Widely Distributed in the Human Microbiome // Biomolecules. – 2020. – Т. 10. – № 8. – 1175. – DOI: 10.3390/biom10081175.

280. Gignac P.M., Valdez D., Morhardt A.C., Lynch L.M. Buffered Lugol's Iodine Preserves DNA Fragment Lengths // Integrative Organismal Biology. – 2024. – Т. 6. – № 1. – С. obae017. – DOI: 10.1093/iob/obae017.

281. Barile F.A. Principles of Toxicology Testing. // CRC Press. – 2007. – DOI: 10.1201/9781420008326.

282. Makhayeva D.N., Irmukhametova G.S., Khutoryanskiy V.V. Polymeric Iodophors: Preparation, Properties, and Biomedical Applications // Review Journal of Chemistry. – 2020. – Т. 10. – № 1-2. – С. 40–57. – DOI: 10.1134/S2079978020010033.

283. Islamov R., Kustova T., Nersesyan A., Ilin A. Subchronic Toxicity of the New Iodine Complex in Dogs and Rats // Frontiers in Veterinary Science. – 2020. – Т. 7. – С. 184. – DOI: 10.3389/fvets.2020.00184.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Патент на изобретение

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 35927

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION

(21) 2020/0750.1

(22) 29.10.2020

(45) 28.10.2022

(54) Ісікке қарсы әсері бар дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран үшиодид хлориді, полипептидті координациялық қосылысы
Координационное соединение дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран триодид хлорид, полипептид, обладающее противоопухолевым действием
Coordination compound of dilithium (I) (1 → 4) - L-D-polyglucane triiodide chloride, a polypeptide having an anti-tumor effect

(73) «Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы» акционерлік қоғамы (KZ)
Акционерное общество «Научный центр противоинфекционных препаратов» (KZ)
«Scientific Center of Anti-Infective Preparations» Joint-Stock Company (KZ)

(72) Абекова Асима Оспановна (KZ) Abekova Asima Ospanovna (KZ)
Исламов Ринат Алимжанович (KZ) Islamov Rinat Alimzhanovich (KZ)
Юлдашева Гульнара Абд-Рашидовна (KZ) Yuldasheva Gulnara Abd-Rashidovna (KZ)
Ильин Александр Иванович (KZ) Ilin Alexandr Ivanovich (KZ)

ЭЦҚ қол қойылды Е. Оспанов
Подписано ЭЦП Е. Оспанов
Signed with EDS Y. Ospanov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Список опубликованных работ

Статьи в изданиях, индексируемых в базе Scopus

1 **A. Abekova,** R. Kenzhebekova, A. Jumagaziyeva, S. Turganbay, A.Ilin, S. Ossikbayeva, A. Kydyrbekova and R.Islamov Comparative Antitumor and Mechanistic Effects of the Iodine–Lithium Complex KC-144 in Cisplatin-Sensitive, Cisplatin-Resistant and Non-Malignant Mesothelial Cells. // *Engineered Science*. – 2026. – Vol. 39, 2033. DOI: 10.30919/es2033, (Q1, процентиль 90)

2 **Abekova, A.,** Islamov, R. ChemoProtective effects of new iodine coordinated compound in benzo[a]pyrene-induced lung cancer in BALB/c mice. // *BIO Web of Conferences*. – 2024. – Vol. 100. – Art. 03001.– DOI:10.1051/bioconf/202410003001 (Q4)

Патент на изобретение

3 Патент на изобретение №35927 от 28.10.2022 г. МПК A61K 31/00 (2006/01), A61K 47/36, A61K 33/00 (2006.01). Координационное соединение дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид, обладающее противоопухолевым действием **Абекова А.О.**, Исламов Р.А., Юлдашева Г.А., Ильин А.И., 2020/0750.1

Глава в международной коллективной монографии

4 G. A. Yuldasheva, G. M. Zhidomirov, **A. O. Abekova** and Ilin AI. Recent Developments on the Mechanism of Anti-Cancer Activity of Complexes of Molecular Iodine with α-Dextrins and Polypeptides and Lithium Halogenides. // *Recent Progress in Microbiology and Biotechnology*. –Vol. 3. – first edition. – 2020. – Chapter 7. – P. 60 - 74. – DOI: 10.9734/bpi/rpmb/v3

Статьи в изданиях, рекомендованных КОКСНВО МНВО РК:

5 **Абекова А.О.,** Кенжебекова Р.Т., Абрамова Ж.С., Исламов Р.А., Нерсесян А.К., Ильин А.И. Разработка альтернативного метода исследования местно-раздражающего действия координационные соединения иода *in vitro* // *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. – 2018. – №2.– С. 134 - 142.

6 Kenzhebekova R.T., **Abekova A.O.,** Raziyeva K.D., Abramova Zh.S., Islamov R.A., Nersesyan A.K., Ilin A.I. Investigation of the impact of iodine coordination compound on production of interleukin-4 and interferon-γ *in vitro* and primary evaluation of local irritation *in vivo* // *International Journal of Biology and Chemistry* 11, № 2 (4). – 2018. – pp. 4-10. – ISSN 2218-7979.

7 **Абекова А.,** Володина Г.В., Исламов Р.А., Абрамова Ж.С., Кенжебекова Р.Т., Ильин А.И., «Оссобености определения цитотоксичности координационного соединения иода *in vitro*» // *Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская*, Казахстан. – 2017 г. – № 3. – С. 141 - 145.

Материалы международных научных конференций:

8 **Абекова А.О.**, Мурзагельдинова С.Г. Изучение иммуномодулирующей и противоопухолевой активности нового комплекса иода КС-144 *in vitro*. // Международная конференция студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ». – 2023. – С. 285-286.

9 A.D. Zhundibayeva, A.O. **Abekova, A.O.** Serikbay. Dendritic cell differentiation and iodine coordination compound toxicity. // *International Scientific Conference of Young Scientists* dedicated to the 40th anniversary of the founding of M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry. – 2023. – P. 61

10 A.A. Serikbay, A.D. Zhundibaeva, **A.O. Abekova**, S.G. Murzageldinova. Study of immunological properties of the drug substance of complex iodine compound on peripheral blood mononuclears. // *International Scientific Conference of Young Scientists* dedicated to the 40th anniversary of the founding of M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry. – 2023. – P. 60

11 **Абекова А.О.**, Кенжебекова Р.Т., Исламов Р.А. Скрининг активности новых координационных соединений иода в отношении опухолевых клеточных линий. // *VI Международные Фарабиевские чтения*. – 2019. – № 4. – С. 236. - ISBN 978-601-04-3934-4.

12 **Абекова А.О.,** Кенжебекова Р.Т., Исламов Р.А., Нерсесян А.К., Ильин А.И. Скрининг координационных соединений иода на специфическую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток // Международный симпозиум Астана Биотех. – 2018. – С. 51.

13 **Абекова А.,** Разиева К., Юлдашева Г. А., Володина Г. В., Исламов Р. А., «Проблемы современной биотехнологии изучение противоопухолевой активности координационного соединения иода» // IV Международные Фарабиевские чтения, Казахстан, издательство: Казак университет. – 2017 г. – № 4. – С. 85.

Материалы зарубежных конференций:

14 **Abekova A.O.,** Kenzhebekova R.T., Islamov R.A., Nersesyan A.K., Ilin A.I. Antiproliferative effect of polyvinylpyrrolidone-iodine complex on rhabdomyosarcoma cells by inducing cell cycle arrest. // *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM 2020.* – 2020. – Vol. 20, Book 6.1. – P. 165–174. – DOI: 10.5593/sgem2020/6.1/s25.022.

15 T. Bukeyeva, S. Kassymbekova, G. Kon, I. Bishimova, Sh. Tursunova, **A. Abekova,** S. Murzageldinova, R. Islamov, A. Ilin, T. Davtyan Differential effect of iodine bioorganic molecular complex on host defense in BALB/c and C57BL/6 mice. // 21st International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery System; Rome, Italy- March 11-12, 2020

16 **A.O. Abekova**, RA. Islamov, AK. Nersesyan and AI. Ilin Synergetic Effect of Coordinated Compounds of Iodine (CC) with Doxorubicin on K562 Cell Line // Synergy Conference, Cancer Pharmacology Research, St. John`s Universiy, Queens, NY, USA December 13-16. – 2017. – P. 83

17 Yuldasheva G.A., Zhidomirov G.M., **Abekova A.O.,** Ilin A.I. The Mechanism of Anti-Cancer Activity of Complexes of Molecular Iodine with α-Dextrins and Polypeptides and Lithium Halogenides. // Journal of Antivirals & Antiretrovirals, ISSN:1948-5964 JAA, Volume 8(2): 072-078. – 2016. – P. 72-78. – DOI:10.4172/jaa.1000138

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акт внедрения

ИНФЕКЦИЯҒА ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ҒЫЛЫМИ ОРТАЛЫҒЫ
SCAID

«Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы» акционерлік қоғамы
050008, Алматы қаласы, Әуезов көшесі, 84
Тел./факс: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

Акционерное общество «Научный центр противоинфекционных препаратов»
050008, город Алматы, ул. Ауэзова, 84
Тел./факс: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

«Scientific Center for Anti-infectious Drugs» Joint Stock Company
050008, Almaty city, Auezov street, 84
Tel./fax: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель председателя Правления по науке АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» канд.хим.наук
_____ А.С. Курманбеков
«___» _____ 2019г.

АКТ
о внедрении основных результатов диссертационной работы PhD докторанта Казахского Национального Университета им. аль-Фараби – Абековой Асимы Оспановны
Тема «Изучение противоопухолевой активности координационного соединения иода для разработки новых лекарственных средств»

Наименование предложения для внедрения: Разработка и исследование новых лекарственных средств на основе иода.
Учреждение, автор: Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, кафедра «Биология и биотехнология», PhD-докторант специальности «6D071000 - Биотехнология» Абекова Асима Оспановна.
Где внедрено: АО «Научный Центр Противоинфекционных Препаратов», научно-техническая программа «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018-2020 годы».
Форма внедрения: Основные результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность Научного центра. Приятны к внедрению научно-исследовательские разработки в соответствии с принципами GLP и рекомендациями руководства ICH Q8 «Фармацевтическая разработка».
Эффективность внедрения: Способ получения субстанции; доклинические испытания разрабатываемого лекарственного средства, в том числе испытания на безопасность в соответствии с международным стандартом GLP; методическая процедура «Определение местно-раздражающего действия *in vitro*».
Охраноспособность объекта научно-инновационного внедрения: Планируется получение патента на полезную модель.
Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: Нет.

Исполнитель
PhD докторант: _____ Абекова А.О.

Управляющий исследовательской базой, к.х.н. _____ Сабитов А.Н.

№ 400

ПРИЛОЖЕНИЕ Г
Прохождение стажировки

INSTITUTE OF CANCER RESEARCH
MEDICAL UNIVERSITY OF VIENNA

Medical University of Vienna
Department of Medicine I
Institute of Cancer Research
Borschkegasse 8a, 1090 Vienna, Austria
T: +43 (0)1 40160-57556
michael.grusch@meduniwien.ac.at
www.meduniwien.ac.at

Assima Abekova,
PhD student at the
Faculty of Biology and Biotechnology
Al-Farabi Kazakh National University
Almaty, Kazakhstan
Email: asima_ashma@mail.ru

Vienna,03-Apr-2019

Re: **Recommendation letter for Assima Abekova**

To whom it may concern

This is to confirm that Ms. Assima Abekova performed an internship at the Institute of Cancer Research, Dept. of Medicine I, Medical University of Vienna, Vienna, Austria from February 4th to April 4th, 2019.

Ms. Abekova is a registered PhD student at the Faculty of Biology and Biotechnology of the Al-Farabi Kazakh National University of the Republic of Kazakhstan. Her studies on the antitumor activity of coordinated compound of iodine for new drug development is supervised by Dr. Rinat Islamov.

During her internship Ms. Assima Abekova obtained knowledge in cancer cell biology and apoptosis research. She was trained to perform several in vitro assays and participated in lectures and seminars at our institute. Overall, the training provided a good understanding of biomedical research methodologies relevant for cancer-related studies.

I have to come to know Ms. Abekova as an ambitious and hardworking PhD student. She learned the methods at a rapid pace and successfully mastered the complex task of interweaving the planning, performing and analysis of multiple experiments within the short time of her internship. Furthermore, she was a pleasant student to supervise and rapidly became a well-respected member of our team.

Techniques used in her internship involved:

- Cell Proliferation and Cell Viability Assay (MTT test, videomicroscopy with JuLi stage)
- Clonogenic assay
- Apoptosis assay by Hoechst 33258/propidium iodide staining
- Cell cycle analysis by flow cytometry
- TUNEL (termination deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assay
- DNA damage assay by H2AX staining

She also acquired the skills to use the software programs required for data analysis of the assays listed above.

Due to her high motivation and enthusiasm, her work has progressed well and her achievements clearly demonstrate that she is a very ambitious, promising young scientist. Moreover, her intellectual grasp and friendly personality are remarkable and I am convinced that she will make her way successfully in any research-oriented position.

Your sincerely,

Institut für Krebsforschung
Universitätsklinik für Innere Medizin I
Medizinische Universität Wien
Borschkegasse 8a
A-1090 Wien

Assoc. Prof., Dr. Michael Grusch, PhD

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

GLP сертификат исследовательской базы

Bundesinstitut für Risikobewertung /
Federal Institute for Risk Assessment

BfR
Bundesinstitut für Risikobewertung

GUTE LABORPRAXIS / GOOD LABORATORY PRACTICE

GLP-Bestätigung / Statement of GLP Compliance

(gemäß / according to § 19b Abs. 2 Nr. 3 Chemikaliengesetz / German Chemicals Act)

Eine GLP-Inspektion zur Überwachung der GLP-Grundsätze wurde durchgeführt in / Assessment of conformity with the GLP Principles was carried out at

Prüfeinrichtung / Test facility

Scientific Center of Anti-infectious Drugs
SCAID
75, Al Farabi Ave
Academic Campus 60
Almaty, 050060
Republic of Kazakhstan

Anwendungsbereich / Area of Expertise

Prüfungen zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften und Gehaltsbestimmungen / Physical-chemical testing

Prüfungen zur Bestimmung der erbgutverändernden Eigenschaften (in vitro) / Mutagenicity studies - *in vitro*

Datum der Inspektion / Date of Inspection

07./08. and 11./12. July 2016

Auf der Grundlage des Inspektionsberichtes wird hiermit bestätigt, dass in dieser Prüfeinrichtung die oben genannten Prüfungen unter Einhaltung der GLP-Grundsätze durchgeführt werden können. /
Based on the inspection report it can be confirmed, that the test facility is able to conduct the aforementioned studies in compliance with the Principles of GLP.

Eine Überprüfung dieser GLP-Bestätigung ist spätestens Ende Juni 2018 zu beantragen. Ohne diesen Antrag wird nach Ablauf der Frist die Prüfeinrichtung aus dem deutschen GLP-Überwachungsprogramm genommen und diese GLP-Bestätigung verliert ihre Gültigkeit. /
Verification of this Statement of GLP Compliance has to be applied end of June 2018 at the latest. Elapsing this term, the test facility will be taken out of the German GLP Monitoring Programme and this Statement of GLP Compliance becomes invalid.

February 28, 2018

Im Auftrag / For the Director

Dr. Wolf Burchard Bulling
GLP-Bundesstelle / GLP Federal Bureau

Bundesinstitut für Risikobewertung / German Federal Institute for Risk Assessment
Max-Dohrn-Straße 8-10
10589 Berlin – GERMANY

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Свидетельство об аккредитации АО «НЦПП»



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аккредитации

г. Астана «7» декабря 2018 г.

В соответствии со статьей 23 Закона Республики Казахстан «О науке»

Акционерное общество

(наименование юридического лица / Ф.И.О. физического лица)

«Научный центр противоинфекционных препаратов»

аккредитуется в качестве субъекта научной и (или) научно-технической деятельности. Свидетельство предоставляется для принятия участия в конкурсе научной и (или) научно-технической деятельности за счет средств государственного бюджета Республики Казахстан

Руководитель
Уполномоченного органа
М.П.

Е. Садыков

Серия МК № 005299

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж
ЛЭК по оценке острой токсичности КС-144

ИНФЕКЦИЯҒА ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ҒЫЛЫМИ ОРТАЛЫҒЫ
SCAID

«Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы» акционерлік қоғамы
050008, Алматы қаласы, Әуезов көшесі, 84
Тел./факс: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

Акционерное общество «Научный центр противоинфекционных препаратов»
050008, город Алматы, ул. Ауэзова, 84
Тел./факс: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

«Scientific Center for Anti-infectious Drugs» Joint Stock Company
050008, Almaty city, Auezov street, 84
Tel./fax: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

01 апреля 2019 года
Протокол № 14/1

Заключение Комиссии по биоэтике
АО «Научный центр противоинфекционных препаратов»

Комиссия по биоэтике АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» рассмотрела материалы исследования, выполняемого в рамках научно-технической программы «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018-2020 гг.» (регистрационный номер О.0777).

Название исследования: РНТ-029 «Изучение острой токсичности субстанции КС-144 при пероральном введении».

Цель исследования: оценить острую пероральную токсичность и установить максимально переносимую дозу КС-144.

Руководитель исследования: НС лаборатории фармакологии и токсикологии Кон Г.А.

Лабораторные животные: аутбредные крыс Wistar возрастом 6-8 недель.

Планируемый дизайн: количество животных, контрольная группа и опытные группы для однократного внутрижелудочного введения КС-144 в дозах указаны в протоколе исследования РНТ-029.

Метод исследования: по протоколу исследования РНТ-029.

Нормативно-методическая основа: OECD Test Guideline 423 «Acute Oral Toxicity Method»; ГОСТ 32644-2014 «Острая пероральная токсичность, метод определения класса острой токсичности»; применимые требования законодательства Республики Казахстан и принципы 3R.

Условия содержания и благополучие животных: соответствуют требованиям ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

Представленные документы: заявка, протокол исследования РНТ-029, в котором описаны обоснование использования лабораторных животных и их количества, сведения об исследуемой субстанции, условия содержания, квалификация исследователей, описание эвтаназии и гуманных конечных точек.

Комиссия установила, что цель исследования научно обоснована, предполагаемая польза соразмерна возможному вреду животным, а дизайн предусматривает минимизацию их количества и страданий при соблюдении принципов Replacement, Reduction и Refinement.

РЕШЕНИЕ: одобрить план исследования РНТ-029.

Председатель комиссии **А.С. Курманбеков**

ПРИЛОЖЕНИЕ И

ЛЭК по оценке влияния КС-144 на продолжительность жизни крыс

ИНФЕКЦИЯҒА ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ҒЫЛЫМИ ОРТАЛЫҒЫ
SCAID

«Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы»
акционерлік қоғамы
050008, Алматы қаласы,
Әуезов көшесі, 84
Тел./факс: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

Акционерное общество
«Научный центр
противоинфекционных
препаратов»
050008, город Алматы,
ул. Ауэзова, 84
Тел./факс: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

«Scientific Center for
Anti-infectious Drugs»
Joint Stock Company
050008, Almaty city,
Auezov street, 84
Tel./fax: +7 (727) 266 52 29
e-mail: scaid@scaid.kz

01 апреля 2019 года
Протокол № 14/2

Заключение Комиссии по биоэтике
АО «Научный центр противоинфекционных препаратов»

Комиссия по биоэтике АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» рассмотрела материалы исследования, выполняемого в рамках научно-технической программы «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018-2020 гг.» (регистрационный номер О.0777).
Название исследования: «Изучение противоопухолевого действия КС-144 на модели аффинитетной опухоли яичника крыс (АфОЯ)»
Цель исследования: оценить влияние КС-144 отдельно и совместно с доксорубицином на продолжительность жизни крыс с перевиваемой АфОЯ.
Руководитель исследования: НС лаборатории фармакологии и токсикологии, к.б.н. Поминова Н.М.
Лабораторные животные: крысы Wistar возрастом 1,5-2,5 месяца.
Модель опухоли: перевиваемая аффинитетная опухоль (карцинома) яичников крыс АфОЯ, получена из НИИ онкологии и радиологии МЗ РК.
Экспериментальные группы: по протоколу исследования.
Схема терапии: по протоколу исследования.
Критерии оценки: по протоколу исследования.
Условия содержания и благополучие животных: соответствуют требованиям ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».
Представленные документы: заявка, протокол исследования, в котором описаны обоснование использования лабораторных животных и их количества, сведения об исследуемой субстанции и модели опухоли, условия содержания, квалификация исследователей, описание эвтаназии и гуманных конечных точек.
РЕШЕНИЕ: одобрить план экспериментального исследования.

Председатель комиссии **А.С. Курманбеков**

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Протокол испытания на субстанции КС-144

Сынау Орталығы
АҚ «Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы»
Аккредитация аттестаты
№ KZ. И.02.1252
Қолдану мерзімі 17.04.2022 ж.

Испытательный центр
АО «Научный центр противоинфекционных препаратов»
Аттестат аккредитации
№ KZ.И.02.1252
Действителен до 17.04.2022 г.

Лаборатория физической и биоорганической химии

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 1

от «03 » января 2019 г

Наименование и адрес заказчика: АО «Научный центр противоинфекционных препаратов»
Основание: определение физико-химических показателей
Вид испытаний: исследование синтезированных соединений
Наименование продукции: субстанция КС-144
Акт отбор образцов: не применимо
Страна, фирма изготовитель: АО «НЦПП» - ОП
Серия/партия: -
Срок хранения: -
Срок проведения испытаний: 27.12.2018 - 03.01.2019
Обозначение НД: ГФ РК, том I, *2.2.3, 2.2.8, 2.2.9, 2.2.5*, ТР-GE-001

Наименование показателей	НД на методы испытаний	Требования НД	Результат	Температура, ^{0}C, Влажность, %	Примечание
1	2	3	4	5	6
Описание	-	-	Вязкая жидкость темно-синего, почти черного цвета без запаха	21,8 ^{0}C, 51 %	-
pH	ГФ РК, том 1, *2.2.3*	-	5,20	21,8 ^{0}C, 51 %	-
Определение плотности	ГФ РК, том 1, *2.2.5*	-	1,0504 г/см^3	15,6 ^{0}C, 94 %	-
Кинематическая вязкость	ГФ РК, том 1, *2.2.8, 2.2.9*	-	1,330 мм^2/с	19,2 ^{0}C, 70 %	-
Содержание иода	ТР-GE-001	-	7,13 г/л (0,71 %)	19,2 ^{0}C, 70 %	-
Содержание иодида	ТР-GE-001	-	10,72 г/л (1,07 %)	19,2 ^{0}C, 70 %	-

Результаты испытаний распространяются только на испытуемые образцы.
Частичная перепечатка протокола без разрешения Испытательного центра АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» запрещена.

Испытания провел:
Зам.зав.лаборатории физической и биоорганической химии — подпись — Кабыл Ж.А.

Научный сотрудник лаборатории физической и биоорганической химии — подпись — Бакишева Г.С.

Научный сотрудник лаборатории физической и биоорганической химии — подпись — Серикбаева К.Т.

Результаты заверил:
Заведующий лабораторией физической и биоорганической химии — подпись — Парецкая Н.А.

АҚ «Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы», Алматы қ., әл-Фараби дан., 75 В
АО «Научный центр противоинфекционных препаратов», г. Алматы, пр. аль-Фараби 75 В
Тел/факс: 8(727) 266-52-29, e-mail:scaid@mail.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ Л
Физико-химические характеристики КС-144

Л.1 Результаты испытаний стабильности жидкой субстанции КС-144

Серия, срок хранения	Описание	Содержание, г/л		Кинематическая вязкость, $мм^2 \cdot с^{-1}$	Относительная плотность, $г/см^3$	pH
		иод	иодид			
01261218, 0 мес.	Вязкая жидкость коричнево-фиолетого, почти черного цвета без запаха	7,13	10,72	1,330	1,0504	5,20
01261218, 3 мес.	Соответствует	7,46	8,72	2,287	1,045	4,47
01261218, 6 мес.	Соответствует	7,53	11,61	1,330	1,0420	4,43
01261218, 9 мес.	Соответствует	7,55	11,06	1,340	1,0440	4,62
01261218, 12 мес.	Соответствует	7,56	10,96	1,348	1,0435	4,64

Л.2 Список протоколов испытаний стабильности жидкой субстанции КС-144



Список протоколов испытаний стабильности жидкой субстанции КС-144, 2019 г.

Номер протокола	Дата	Субстанция, серия	Месяц стабильности
1	03 января 2019	КС-144, серия 01261218	0
23	05 апреля 2019	КС-144, серия 01261218	3
46	01 июля 2019	КС-144, серия 01261218	6

Подпись

Начальник отдела кадров

Парецкая Н.А.

Л.3 Результаты испытаний стабильности КС-144

Серия, срок хранения	Описание	Содержание, г/кг		Потеря в массе при высушивании, %	Растворимость в воде	pH	Температура плавления, ^{0}C
		иод	иодид				
01090119, 0 мес. 3 мес. 6 мес. 9 мес. 12 мес.	Порошок коричнево-фиолетого цвета со слабым запахом иода Соответствует	46,10,13 48,27 48,30 48,41	113,04 66,38 69,68 72,23	2,25 1,25 1,35 1,36	1 г/20 мл 1 г/20 мл 1 г/20 мл 1 г/20 мл	4,84 3,78 4,67 4,78	170 168 162 161
02230519, 0 мес. 3 мес. 6 мес.	Порошок коричнево-фиолетого цвета со слабым запахом иода Соответствует	43,40 45,85 46,03	68,10 72,51 73,02	2,49 2,46 2,45	1 г/20 мл 1 г/20 мл 1 г/20 мл	4,69 4,81 4,84	162 162 163
03230819, 0 мес. 3 мес.	Порошок коричнево-фиолетого цвета со слабым запахом иода Соответствует	46,19 46,21	58,31 61,04	2,48 2,51	1 г/20 мл 1 г/20 мл	4,82 4,84	160 162

Л.4 Список протоколов испытаний стабильности сухой субстанции КС-144



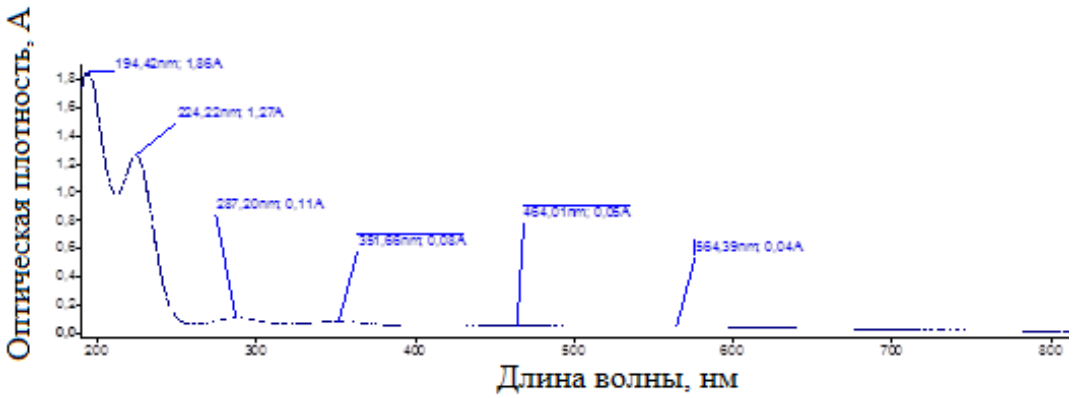
Список протоколов испытаний стабильности сухой субстанции КС-144, 2019 г.

Номер протокола	Дата	Субстанция, серия	Месяц стабильности
2	15 января 2019	КС-144, серия 01090119	0
26	09 апреля 2019	КС-144, серия 01090119	3
37	29 мая 2019	КС-144, серия 02230519	0
47	02 июля 2019	КС-144, серия 01090119	6
59	02 сентября 2019	КС-144, серия 03230819	0
60	03 сентября 2019	КС-144, серия 02230519	3

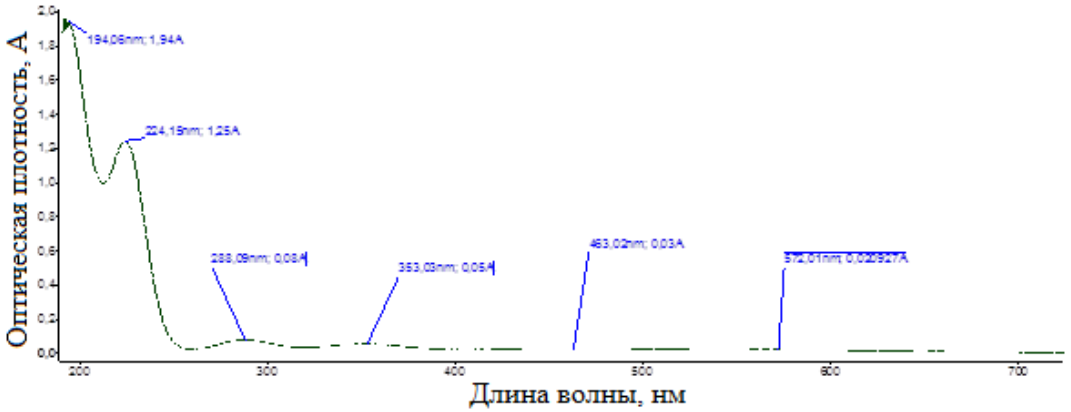
Парецкая Н.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ М
УФ спектры субстанции КС-144

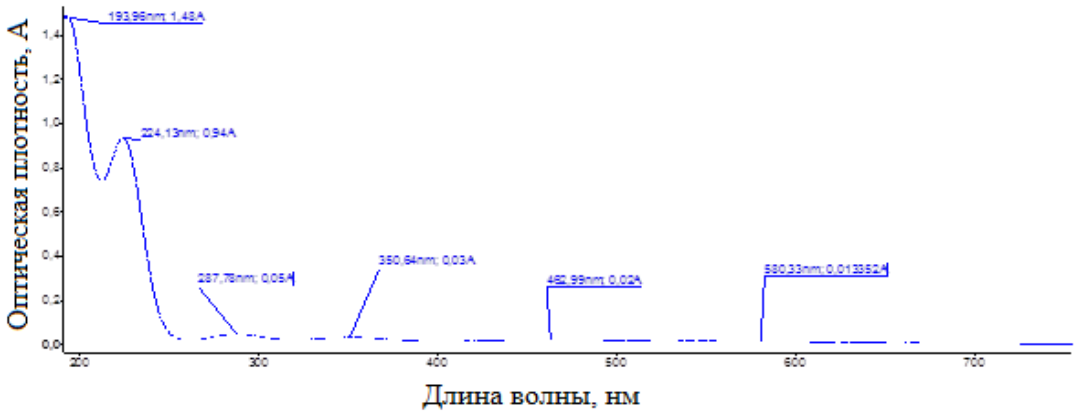
М.1 УФ спектр КС-144, серия 01090119



М.2 УФ спектр КС-144, серия 02230519



М.3 УФ спектр КС-144, серия 03230819



М.4 Спектральные характеристики субстанции КС-144 (ИК спектры)

КС-144, серия 01090119, волновое число полосы ν, $см^{-1}$	КС-144, серия 02230519, волновое число полосы ν, $см^{-1}$	КС-144, серия 03230819, волновое число полосы ν, $см^{-1}$	Отнесение
3311,3	3317,6	3317,6	ν_{as} -NH_2, -NH_3^+ ,-CH_2, ν -OH
2925,2	2917,1	2925,3	ν_{as} -CH_2
-	2847,7	-	ν_s -CH_2
1646,2	-	-	δ -NH, -NH_3^+ ,-CH_2
-	-	1613,6	δ -NH_3^+
1556,4	-	-	δ -NH
1507,8	1515,6	1519,6	δ_s -NH_3^+
1458,3	1458,3	-	δ_{as} -CH_3, ножничные δ –CH_2
1417,5	1409,3	1417,5	δ - CH_2
1364,4	1364,4	1380,3	δ_s -CH_3, ω(веер.) -CH_2
1337,9	1331,7	1331,7	δ -CH_2
1294,9	1294,4	-	τ (крутил.) -CH_2
1241,8	-	-	δ -CH
-	1229,5	1225,4	ν -C-N
1147,4	1143,7	1147,8	
1102,8	-	1106,9	ν_{as} -C-O-C, ν -C-OH
1074,8	1074,4	1074,2	ν_{as} -C-O-C, ν -C-OH
1015,1	1016,1	1016,2	ν -CO, δ -OH
935,3	931,2	939,4	Неплоскост., δ -OH
923,0	-	-	δ -NH
855,5	853,6	-	δ –OH, ω(веер.) –NH,
752,5	753,7	755,5	Скелетные, δ –CH, Ион иодата IO_3, маятник. δ –CH_2
701,0	-	710,4	ω(веер.) -NH
-	-	673,0	Внеплоскост., δ -OH

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Дополнительные фармакологические и токсикологические результаты субстанции КС-144

Материалы получены в рамках выполнения научно-технической программы «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2018–2020 гг.», задание О.0777, государственный регистрационный № 0118РК00003, и представлены в годовом отчете лаборатории фармакологии и токсикологии АО «НЦПП» за 2019 год.

	Scientific Centre for Anti-infectious Drugs Научный центр противоинфекционных препаратов	
	Study Plan	Study No.: PHT- 029 Page: 1 of 15

Scientific Center for Anti-infectious Drugs /
Научный центр противоинфекционных препаратов
Al-farabi Ave 75B, / Пр. аль-Фараби 75Б,
Almaty, 050060, / Алматы, 050060,
Republic of Kazakhstan / Республика Казахстан

Study Title: / Название исследования:	**Изучение острой токсичности субстанции КС-144 при пероральном введении**
Study No.: / № исследования:	**PHT-029**
Test item: / Исследуемое вещество:	**КС-144**
Test subject: / Объект исследования:	**Крысы**

Date: 13.05.2019 Signature:

Study Director:
Kon Galina

Date: 13.05.2019 Signature:

Head of preclinical trials department:
Dr. Rinat Islamov