АННОТАЦИЯ

Диссертационной работы на соискание степени доктора философии (Ph.D.)
по специальности 6D070100 – «Биотехнология»
Абековой Асимы Оспановны
на тему: **«Изучение противоопухолевой активности координационного соединения иода для разработки новых лекарственных средств»**

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена изучению фармацевтических, биологических и фармакологических свойств нового координационного соединения иода с потенциальной противоопухолевой активностью - дилитий (I) (1→4)-L-D-полиглюкопиран трииодид хлорид, полипептид (далее, КС-144).

Актуальность исследования. Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смертности в мире и представляют собой одну из наиболее значимых проблем современной медицины. Несмотря на значительные достижения в области химиотерапии, таргетной терапии и иммунотерапии, эффективность лечения многих злокачественных опухолей по-прежнему ограничена системной токсичностью, выраженной гетерогенностью опухолей, а также развитием лекарственной устойчивости. 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 новых малотоксичных противораковых средств, которые повышают или возвращают чувствительность опухолевых клеток с лекарственной устойчивостью к существующему арсеналу препаратов. Таким подходом может быть реактивация апоптотической смерти раковых клеток. К веществам, вызывающим активацию апоптоза можно отнести иод и его производные. 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. 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, а следовательно, 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. Такие соединения могут обладать механизмами действия, отличными от механизмов действия классических цитостатических лекарств, в частности, они могут влиять на окислительно-восстановительный гомеостаз, функцию митохондрий, клеточный цикл и процессы запрограммированной клеточной смерти. Поэтому, поиск и разработка новых иодсодержащих координационных систем является актуальной задачей как для фармацевтической химии, так и для экспериментальной онкологии.

В диссертационной работе в качестве объекта исследования рассматривалось новое координационное соединение иода КС-144, представляющее интерес как потенциальное противоопухолевое средство. Целью исследования было изучение его физико-химических, биологических и фармакологических свойств, оценка его противоопухолевой активности *in vitro* и *in vivo*, а также анализ молекулярных и клеточных механизмов действия. Особое внимание уделялось изучению влияния соединения КС-144 на жизнеспособность опухолевых клеток, клеточный цикл, митохондриальный мембранный потенциал, окислительный статус и индукцию апоптоза. Кроме того, в работе рассматривалось комбинированное действие соединения КС-144 с известными противоопухолевыми препаратами, что имеет большое значение с точки зрения современных стратегий повышения эффективности терапии и преодоления лекарственной устойчивости.

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.

Объекты исследования: координационное соединение иода с биополимерами, обладающее противоопухолевой активностью. Культуры нормальных и опухолевых клеток из Американской коллекции типированных культур (ATCC, Manassas, США). Перевиваемая аффинитетная опухоль (карцинома) яичника крыс (АфОЯ) (Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии). Тест-штаммы микроорганизмов ATCC и NBRC, лабораторные крысы Wistar.

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.

Методы исследования. В работе использован комплекс современных физико-химических, фармацевтических, биологических, микробиологических 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. Биологическая активность вещества *in vitro* оценивалась с использованием методов культивирования клеток, определения жизнеспособности, пролиферативной и цитотоксической активности, анализа апоптоза, колониеобразования, клеточного цикла, фрагментации ДНК методом TUNEL, определения мембранного потенциала митохондрий, оценки окислительного стресса, микроядерного теста, вестерн-блоттинга, а также методов проточной цитометрии, электрофореза, флуоресцентной и световой микроскопии. В рамках исследования генотоксичности использовали методы субкультивирования, реактивации, криоконсервации и оценки бактериальной мутагенной активности. Исследования *in vivo* включали оценку острой токсичности и противоопухолевой эффективности КС-144 на крысах; выживаемость животных анализировали методом Каплана–Мейера с оценкой межгрупповых различий с использованием log-rank теста.

Научная новизна исследования. В рамках выполнения научного диссертационного исследования получены комплексные экспериментальные данные, характеризующие физико-химические, фармацевтические, биологические и фармакологические свойства нового координационного соединения иода КС-144 с потенциальной противоопухолевой активностью.

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 вещество КС-144 проявляет биологическую активность в отношении как чувствительных, так и лекарственно-резистентных опухолевых клеточных линии, 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.

Проведена предварительная оценка эффективности КС-144 в комбинации с доксорубицином на экспериментальной модели перевиваемой аффинитетной опухоли яичника крыс (АфОЯ), 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».

Практическая значимость исследования состоит в том, что разработана технологическая схема получения лекарственной субстанции КС-144, которая может быть использована при создании опытно-промышленного регламента производства. Проведенная стандартизация субстанции и определение основных показателей качества создают основу для дальнейшей фармацевтической разработки лекарственных форм. Результаты исследования внедрены в практическую деятельность опытного производства НЦПП, что подтверждается актом внедрения. Полученные данные о фармакологической эффективности и токсичности КС-144 могут быть использованы при планировании последующих доклинических исследований. Результаты работы создают экспериментальную основу для дальнейшей фармацевтической разработки КС-144 как лекарственной субстанции, потенциально применимой в составе комбинированной противоопухолевой терапии.

Теоретическая значимость 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 компонента комбинированной противоопухолевой терапии.

Основные положения диссертации, 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 ± 2 °С и влажности 60 ± 5 % и может быть использована для разработки новых фармацевтических форм.
3. Показано, что клетки мезотелиомы Р31 и Р31res1.2 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. Синергидный эффект КС-144 и доксорубицина покзан на линии клеток К562, а также на клетках мезотелиомы Р31 и Р31res1.2 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 батареи тестов *in vitro* на генотоксичность методом Эймса и в микроядреном анализе клеток мышинной лимфомы L5178Y 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%.

Все поставленные в диссертации задачи выполнены.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнялась в рамках задач Научно-технической программы «Разработка новых противоинфекционных препаратов на 2015-2017 и 2018-2020 гг» Министерства индустрии и инфраструктурного развития Республики Казахстан (регистрационный номер программы № О.0777).

Личный вклад докторанта в подготовку каждой публикации включает обзор научной литературы, планирование и проведение экспериментов, сбор полученных данных, их интерпретацию и статистическую обработку, а также описание результатов с последующим обсуждением.

Апробация научно-исследовательской работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на международных научных конференциях, конгрессах, форумах и круглых столах: IV Международные Фарабиевские чтения, Казахстан (2017); Международном симпозиуме Астаны Биотех (2018); на VI Международные Фарабиевские чтения, (04/2019); International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM (2020); Международной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ» (2023); 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); BIO Web of Conferences 100, 03001 (2024).

Публикации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 16 научных работ и получен 1 патент на изобретение Республики Казахстан, в том числе: 2 статьи в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе данных Scopus; 3 статьи в изданиях, рекомендованных КОКСНВО МНВО РК; 1 статья в зарубежном рецензируемом журнале; 1 глава в международной коллективной монографии; 9 публикаций в материалах международных научных конференций.