

ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ И ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. А.Е. АРБУЗОВА
– ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ
ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ЛЮБИНА АННА ПАВЛОВНА

**Биохимические аспекты механизмов цитотоксического и антимикробного
действия новых производных фосфониевых солей**

1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, ст. научный сотрудник
А.Д. Волошина

Казань – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Современные тенденции и проблемы лечения онкологических заболеваний	14
1.1.1 Основные стратегии борьбы с онкологическими заболеваниями	14
1.1.2 Особенности раковых клеток	14
1.1.3 Митохондрии.....	16
1.1.4 Активные формы кислорода.....	17
1.1.5 Апоптоз	18
1.2 Современные проблемы и тенденции антимикробной терапии	19
1.2.1 Основные причины возникновения лекарственной резистентности.....	19
1.2.2 Современные подходы к созданию антимикробных агентов	22
1.3 Фосфониевые соли как биологически-активные соединения	24
1.3.1 Общая характеристика фосфониевых солей.....	24
1.3.2 Митохондриально-направленные фосфониевые соли	25
1.3.3 Цитотоксические свойства фосфониевых солей	31
1.3.3.1 Механизм противоопухолевого действия фосфониевых солей.....	31
1.3.3.2 Взаимосвязь «структура-активность» в рядах фосфониевых солей с противоопухолевой активностью	34
1.3.4 Антимикробная активность фосфониевых солей.....	35
1.3.4.1 Спектр антимикробного действия фосфониевых солей	35
1.3.4.2 Механизм антимикробного действия фосфониевых солей	38
1.3.4.3 Связь структура-активность в рядах фосфониевых солей с антимикробной активностью	40

1.3.4.4 Сравнение антимикробных свойств фосфониевых и аммониевых солей	44
1.3.5 Фосфониевые соли, обладающие антимикробными и цитотоксическими свойствами	48
1.3.6 Другие биологические свойства фосфониевых солей	49
Заключение к обзору литературы.....	51
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	52
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1 Клеточные линии, используемые в работе.....	52
2.2 Штаммы тест-микроорганизмов, используемые в работе.....	54
2.3 Химические соединения и реагенты, используемые в работе	55
2.5 Изучение цитотоксических свойств фосфониевых солей	55
2.5.1 Определение гемолитической активности	55
2.5.2 Оценка цитотоксичности на клеточных линиях человека с помощью МТТ - теста	56
2.5.3 Оценка индукции апоптоза в клетках после воздействия исследуемых соединений.....	57
2.5.4 Оценка изменения митохондриального мембранного потенциала	57
2.5.5 Оценка уровня АФК в клетках	58
2.5.6 Оценка изменений клеточного цикла	58
2.5.7 Исследование адгезивных свойств клеток М-HeLa в режиме реального времени.....	59
2.5.8 Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза и генотоксичности	60
2.6 Изучение антимикробных свойств фосфониевых солей	60
2.6.1 Определение минимальной ингибирующей и бактерицидной (фунгицидной) концентрации.....	60
2.6.2 Исследование лекарственной резистентности	61

2.6.3 Исследования антимикробной активности фосфониевых солей по времени гибели	61
2.6.4 Влияние фосфониевых солей на биопленки <i>S. aureus</i>	62
2.6.5 Оценка влияния фосфониевых солей на целостность цитоплазматической мембраны бактерий.....	63
2.6.6 Оценка изменения мембранного потенциала бактерий <i>S. aureus</i>	64
2.6.7 Анализ морфологических изменений <i>S. aureus</i> методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).....	64
2.6.8 Анализ протеомного профиля <i>S. aureus</i>	65
2.7 Статистическая обработка результатов	66
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	67
3.1 Изучение цитотоксических свойств фосфониевых солей	67
3.1.1 Определение гемолитической активности исследуемых фосфониевых солей	67
3.1.2 Цитотоксичность исследуемых фосфониевых солей на клеточных линиях человека.....	67
3.1.3 Оценка селективности соединений в отношении раковых клеточных линий человека.....	71
3.1.4 Индукция апоптоза в клетках М-HeLa в результате воздействия исследуемых соединений	73
3.1.5 Оценка изменения митохондриального мембранного потенциала	75
3.1.6 Оценка уровня АФК в клетках	75
3.1.7 Оценка изменений клеточного цикла	75
3.1.8 Исследование адгезивных свойств клеток М-HeLa в режиме реального времени.....	77
3.1.9 Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза.....	79

3.1.10 Мультиплексный анализ маркеров повреждения ДНК/ генотоксичности	79
3.2 Изучение антимикробных свойств новых производных фосфониевых солей	80
3.2.1 Определение Минимальной ингибирующей и бактерицидной/ фунгицидной концентрации	80
3.2.2 Оценка селективность антимикробного действия исследуемых соединений	84
3.2.3 Исследование лекарственной резистентности	86
3.2.4 Влияние исследуемых соединений на биопленки	87
3.2.5 Исследования антимикробной активности фосфониевых солей по времени гибели	88
3.2.6 Оценка влияния фосфониевых солей на целостность цитоплазматической мембраны бактерий	88
3.2.7 Оценка изменения мембранного потенциала бактерий	91
3.2.8 Анализ морфологических изменений <i>S. aureus</i> методом ПЭМ	91
3.2.9 Анализ протеомного профиля <i>S. aureus</i>	93
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	96
4.2 Цитотоксические свойства новых производных фосфониевых солей	96
4.1 Антимикробная активность новых производных фосфониевых солей	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	113
ПРИЛОЖЕНИЕ	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Отсутствие универсальных терапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний, на фоне повсеместного роста заболеваемости, усугубляется проблемой резистентности опухолевых клеток к существующей химиотерапии. Параллельно, глобальное распространение антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов, в частности, метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, существенно ограничивает возможности лечения инфекционных осложнений, возникающих у иммунокомпрометированных пациентов, в том числе при онкопатологии [Han *et al.*, 2020]. В связи с этим, разработка новых соединений, обладающих комбинированной активностью – направленной как против опухолевых клеток, так и против патогенной микробиоты – представляется чрезвычайно актуальной и перспективной задачей.

Решение указанной задачи невозможно без углубленного исследования фундаментальных основ взаимодействия потенциальных агентов с биологическими мишенями. Фрагментарность знаний о молекулярных механизмах действия многих известных соединений является ключевым препятствием для целенаправленного дизайна эффективных лекарственных средств. В этой связи, приоритетным направлением является не только скрининг биологической активности новых классов соединений, но и всестороннее изучение их биохимических механизмов действия, включая идентификацию молекулярных мишеней, анализ влияния на ключевые клеточные процессы (клеточный цикл, апоптоз, окислительный гомеостаз) и исследование взаимодействия с клеточными мембранами. Такой системный подход позволяет установить взаимосвязь «структура–активность» на фундаментальном уровне и является основой для рационального конструирования новых препаратов.

С этой точки зрения, производные фосфониевых солей представляют собой высокоинформативный объект для биохимических исследований. Присущая этим соединениям структурная особенность – наличие липофильного катиона –

предопределяет их высокое сродство к биологическим мембранам и способность к эффективному транспорту в клетки и субклеточные компартменты, в первую очередь, в митохондрии [Ross *et al.*, 2006]. Данные литературы подтверждают, что фосфониевые соли могут выступать в качестве митохондриально-направленных агентов, индуцирующих апоптоз в опухолевых клетках, а также проявлять выраженную антимикробную активность [Millard *et al.*, 2010; Mansour *et al.*, 2022; Ermolaev *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2020]. Однако, комплексные сравнительные исследования, направленные на выявление общих и специфических биохимических механизмов цитотоксического и антимикробного действия в рамках одного гомологического ряда соединений, в настоящее время остаются малочисленными [Bittner *et al.*, 2019; Tsepaeva *et al.* 2021].

В лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН был разработан метод получения фосфониевых солей, позволяющий легко варьировать различные по характеру заместители у атома фосфора и их длину. В результате был получен новый класс фосфониевых солей, содержащих фенольный фрагмент [Tatarinov *et al.*, 2016]. В данном классе соединений биологически активный фрагмент (производное фенола) ковалентно встроен в структуру катиона. Предполагается, что такие гибридные молекулы, сочетающие в себе мембранотропные свойства и собственную фармакофорную активность, могут обладать цитотоксическими и антимикробными свойствами, специфическим механизмом действия и не вызывать устойчивости у тест-штаммов микроорганизмов.

В соответствии с вышеизложенным, **целью** данной работы явилось определение биохимических механизмов цитотоксического и антимикробного действия новых производных фосфониевых солей.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать цитотоксичность новых производных фосфониевых солей *in vitro* в отношении опухолевых, условно-нормальных клеточных линий человека и эритроцитов крысы.

2. Изучить влияние соединений на ключевые биохимические процессы в опухолевых клетках: клеточный цикл, апоптоз, генерацию АФК.
3. Охарактеризовать антимикробную активность исследуемых производных, в том числе в отношении резистентных штаммов и биопленок *Staphylococcus aureus*.
4. Исследовать молекулярные аспекты взаимодействия фосфониевых солей с бактериальными клетками: изменения протеомного профиля и мембранотропные свойства.

Научная новизна

В данной работе впервые установлены фундаментальные биохимические закономерности, определяющие механизм биологического действия нового класса фенолсодержащих производных фосфониевых солей. Впервые предложен механизм противоопухолевого действия данного ряда производных на биохимическом уровне. Доказано, что цитотоксичность исследуемых соединений в отношении опухолевых клеток человека реализуется за счет индукции внутреннего пути апоптоза, инициируемого через нарушение функций митохондрий и последующую активацию каспазного каскада. Впервые охарактеризован механизм антимикробного действия тестируемых фосфониевых солей, заключающийся в первичном мембранотропном эффекте. Установлено, что соединения-лидеры вызывают деполяризацию и последующую пермеабиллизацию цитоплазматической мембраны грамположительных бактерий, что объясняет их высокую эффективность против резистентных штаммов и биопленок *Staphylococcus aureus* и отсутствие появления резистентности. Впервые выявлена универсальная мембранотропность действия данного ряда фосфониевых солей и установлены принципиальные различия в последующих биохимических событиях, определяющих селективный клеточный ответ: регулируемый апоптоз в эукариотах и неконтролируемый коллапс мембранного потенциала у прокариот.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в установлении фундаментальных биохимических закономерностей, определяющих механизм

биологического действия производных фосфониевых солей. Полученные данные вносят вклад в понимание основ мембранотропной активности катионных соединений и их способности специфически нарушать функции митохондрий в опухолевых клетках.

Практическая значимость исследования состоит в идентификации перспективных соединений-лидеров, которые могут служить структурной основой для разработки новых препаратов с направленным действием на митохондриальный аппарат опухолевых клеток. Доказанная эффективность соединений в отношении резистентных штаммов и биопленок *Staphylococcus aureus* при отсутствии развития перекрестной устойчивости открывает перспективы для создания новых антибиотиков, преодолевающих существующие механизмы резистентности.

Методология и методы исследования

Исследования проводили на опухолевых и условно-нормальных клеточных линиях человека, а также на микроорганизмах III-IV групп патогенности. При изучении механизма действия фосфониевых солей, использовались флуоресцентные красители. Результаты детектировали методами флуориметрии и цитофлуориметрии. Изменение морфологии бактерий оценивали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Анализ белкового профиля бактерий проводили методом двумерного электрофореза и масс-спектрометрии. Оценку маркеров раннего апоптоза и маркеров повреждения ДНК проводили в лизатах клеток M-HeLa на приборе MagPix («MerkMillipore», США).

Достоверность результатов

Степень достоверности обосновывается большим количеством исследований, результатов, полученных с использованием современного высокоточного оборудования и проанализированных с помощью соответствующего программного обеспечения. Полученные результаты подвергнуты соответствующим современным методам статистической обработки. Перечисленные выше исследования были опубликованы в рецензируемых отечественных и международных изданиях, рекомендованных ВАК, таких как

Bioorganic Chemistry, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Biomedical Chemistry: Research and Methods, Прикладная биохимия и микробиология, Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. Результаты опубликованы также в материалах всероссийских и международных научных конференций.

Положения, выносимые на защиту:

1. Цитотоксическая и антимикробная активность новых производных фосфониевых солей определяется длиной алкильного радикала, регулирующей их липофильность и эффективность взаимодействия с ключевыми биологическими мишенями — митохондриями эукариот и цитоплазматической мембраной прокариот.

2. Охарактеризован механизм селективной цитотоксичности: соединения-лидеры индуцируют в опухолевых клетках апоптоз по митохондриальному пути через деполяризацию мембраны митохондрий и активацию каспазного каскада.

3. Доказан универсальный мембранотропный механизм антимикробного действия, объясняющий высокую бактерицидную активность против резистентных штаммов и биопленок *S. aureus* и отсутствие развития резистентности *in vitro*.

Место выполнения работы и личный вклад соискателя

Работа выполнена в лаборатории микробиологии Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

Автор принимал участие в постановке целей и задач исследования, лично проводил эксперименты по оценке цитотоксичности, определению антимикробной активности (в том числе по времени гибели), по изучению развития резистентности, влияния на биопленки и мембранотропного действия исследуемых соединений. Совместно с сотрудниками лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений ИОФХ им. А.Е. Арбузова – Обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН – к.х.н. Татариновым Д.А., к.х.н. Тереховой Н.В.,

к.х.н. Кузнецовым Д.М. был проведен анализ зависимости «структура-активности» исследуемых фосфониевых солей. Лично автором были также проведены: скрининг для определения гемолитической активности и цитотоксичности соединений, исследования клеточного цикла, пролиферации в режиме реального времени, индукции апоптоза, снижения митохондриального мембранного потенциала, генерации АФК, а также мультиплексный анализ 7 маркеров раннего апоптоза и 7 маркеров повреждения ДНК и генотоксичности. Первичная пробоподготовка образцов для ПЭМ, лазерной конфокальной микроскопии и протеомных исследований также была проведена диссертантом лично. Автор лично проводил анализ литературных данных, интерпретировал результаты.

Апробация результатов

Материалы диссертации представлены на конференциях различного уровня: 55-я ежегодная научная встреча Европейского общества клинических исследований (Bari, Italy, on-line, 2021), Международная юбилейная конференция, посвященная 100-летию основания кафедры микробиологии в Казанском университете «Микробиология вчера, сегодня, завтра» (Казань, 2021), IV Всероссийская с международным участием школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2021), III Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2021), Всероссийская научная конференция с международным участием "Современные проблемы органической химии", посвященная 90-летию со дня рождения академика Валентина Афанасьевича Коптюга (Новосибирск 2021), II школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2020), 2-ая Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Биохимия-основа наук о жизни» (Казань, 2019), III Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2018), X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз»

(Казань, 2017), 21-ая Международная Пуштинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2017).

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых российских и зарубежных журналах, в том числе индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, 12 тезисов в сборниках материалов конференций, 1 из которых в зарубежных изданиях и 9 – индексируемых в базе РИНЦ.

Связь работы с научными программами

Работа была частично выполнена в рамках проекта РФФИ № 14-50-00014 «Формирование на базе Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН международного научно-инновационного Центра нейробиологии и фармакологии» (2014-2018 гг.). Кроме того, настоящее исследование является частью Госзадания темы № НИОКТР 122011800131-8 «Создание научной платформы для направленного молекулярного дизайна и получения биологически активных веществ с целью разработки средств диагностики и лечения заболеваний человека и животных» ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из стандартных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 13 таблиц (включая 1 в Приложении) и 32 рисунка. Библиография содержит 223 наименований российских и зарубежных авторов.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность своему научному руководителю к.б.н. Волошиной А.Д. за всестороннюю поддержку, помощь в интерпретации результатов и написании работы. Выражается благодарность сотрудникам лаборатории микробиологии ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ

КазНЦ РАН за помощь в проведении экспериментов, сотрудникам лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН – Татаринovu Д.А., Тереховой Н.В., Кузнецову Д.М. за предоставленные объекты исследования, сотрудникам лаборатории Химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН за содействие в проведении анализа маркеров раннего апоптоза и генотоксичности, сотрудникам Междисциплинарного центра протеомных исследований КФУ, междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ и лаборатории физико-химического анализа ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН за помощь в проведении протеомных исследований, лазерной конфокальной микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии и интерпретации их результатов. Автор выражает искреннюю признательность своему первому научному руководителю к.х.н. Агафоновой М. Н. за полученные основные навыки работы в лаборатории и привитый интерес к научным исследованиям.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные тенденции и проблемы лечения онкологических заболеваний

1.1.1 Основные стратегии борьбы с онкологическими заболеваниями

Согласно данным ВОЗ, рак остается одной из ведущих причин смертности во всем мире. На его долю приходится почти каждый шестой случай смерти в мировой практике [World Health Organization Cancer, 2022], и почти каждый пятый человек за весь период жизни подвержен риску этого заболевания [World Health Organization Cancer Topics, 2022]. Рак – это большая группа заболеваний, при которых происходит неконтролируемое деление клеток в организме. Злокачественные новообразования могут затронуть практически все органы и ткани в организме. В настоящее время основными стратегиями для лечения рака являются хирургия, лучевая и/или системная терапия (химиотерапия, гормональная терапия, таргетная биотерапия) [World Health Organization Cancer, 2022]. Как правило, хирургическое вмешательство эффективно против больших обособленных опухолей на ранних стадиях рака, однако это приводит к снижению иммунитета, и, как следствие, увеличивает риск инфекционных заболеваний. Лучевая терапия – длительное и дорогостоящее лечение, которое также может вызывать некоторые осложнения [Peyraga *et al.*, 2021]. Использование химиотерапии также небезопасно. Лекарственные средства (ЛС) часто бывают неселективными и убивают не только раковые клетки, но и нормальные [Xie *et al.*, 2020]. Таким образом, одним из актуальных направлений в области лечения рака является поиск и разработка селективных противоопухолевых агентов, действующих только на раковые клетки.

1.1.2 Особенности раковых клеток

Раковые клетки во многом отличаются от нормальных. Одной из отличительных черт является гипоксия в опухолевой ткани, которая усугубляется с увеличением размера опухоли. Гипоксия возникает из-за высокого потребления кислорода в постоянно пролиферирующих клетках, в то время как сосудистая

система не способна снабжать эту ткань в достаточном количестве. В итоге метаболизм (основной источник энергии) раковых клеток переключается от окислительного фосфорилирования к гликолизу [Carvalho *et al.*, 2019]. В условиях гипоксии происходит индукция фактора транскрипции HIF-1, который регулирует транскрипцию некоторых генов, отвечающих за ангиогенез и перепрограммирование энергетического метаболизма [Nagao *et al.*, 2019]. Однако преобладание гликолиза наблюдается и в нормоксических условиях (с нормальным доступом кислорода) в раковых клетках. Так в 1920-х годах Отто Варбург показал, что опухолевые клетки в больших количествах потребляют глюкозу и посредством гликолиза превращают ее в лактат. Некоторые онкогены влияют на транспорт глюкозы, который в норме контролируется глюкозным транспортером GLUT-1, который есть на мембранах всех клеток и ответствен за базовый транспорт глюкозы в клетки [Warburg *et al.*, 1927; Park *et al.*, 2020].

Еще одной отличительной особенностью раковых клеток является повышенное поглощение питательных веществ. Из-за постоянной пролиферации клеткам необходимы строительные молекулы: нуклеотиды (для синтеза ДНК и РНК), аминокислоты (для синтеза белков) и липиды (для синтеза мембран) [Finley, 2023].

Таким образом, логично предположить, что одним из подходов к лечению рака может быть ингибирование гликолитического пути и/или транспорта глюкозы в клетку. Однако недавнее исследование опровергло это предположение. Ученые показали, что ингибирование лактатдегидрогеназы в раковых клетках снизило активность гликолиза, но не привело к снижению активности опухоли в целом [Flores *et al.*, 2019].

Несмотря на то, что все типы опухолевых клеток показывают высокую активность гликолиза, не у всех раковых клеток снижается митохондриальная функция. Окислительное фосфорилирование продолжает быть источником энергии для клеток [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007].

Устойчивость опухоли к химиотерапии часто связана с тем, что в раковых клетках сложнее запускается апоптоз. Например, из-за онкобелков, таких как BCL-

2 (клеточный белок, ингибирует апоптоз [Bostwick, Meiers, 2009], который взаимодействует с BAX (проапоптотический белок, способствует пермеабиллизации внешней митохондриальной мембраны [Jha, Kitsis, 2011]), предотвращает его олигомеризацию и, как следствие, не происходит изменение проницаемости митохондриальной мембраны. Так как пермеабиллизация митохондриальной мембраны является одним из сигналов для запуска апоптоза, то при воздействии антиапоптотического белка BCL-2, апоптоз не запускается.

Кроме того, в раковых клетках наблюдается повышенный уровень активных форм кислорода (АФК), которые не только являются продуктом нормального метаболизма, но также играют важную роль в клеточной сигнализации. Таким образом, еще одним подходом к лечению рака является воздействие на АФК в клетках: или снижение их уровня с помощью антиоксидантов, что может снизить пролиферацию, или наоборот усиленная генерация АФК, что впоследствии приведет к гибели клеток [Reczek, Chandel, 2017].

Исходя из вышеописанного, можно заключить, что митохондрии являются многообещающей мишенью для противоопухолевых соединений.

1.1.3 Митохондрии

Митохондрии – это органеллы эукариотических клеток, которые состоят из двух мембран – внешней и внутренней. Внутренняя мембрана образует складки – кристы, а также ограничивает матрикс митохондрий. Между внешней и внутренней мембранами находится межмембранное пространство. Одной из основных функций митохондрий является производство АТФ за счет окислительного фосфорилирования. Окислительное фосфорилирование осуществляется несколькими белковыми комплексами, находящимися на внутренней мембране митохондрий. Эти белки образуют электрон-транспортную цепь (ЭТЦ). В результате последовательных окислительно-восстановительных реакций белковые комплексы ЭТЦ претерпевают конформационные изменения для того, чтобы перекачивать протоны из матрикса в межмембранное пространство. Митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$), образующийся в результате окислительного фосфорилирования, также необходим для транспорта белков в

митохондрии, характеризуя ответ клетки на дисфункции митохондрий [Nunnari, Suomalainen, 2012].

В ходе окислительного фосфорилирования белковые комплексы ЭТЦ генерируют активные формы кислорода, которые могут повредить ключевые компоненты клеток, включая липиды, нуклеиновые кислоты и белки. Считается, что АФК способствуют развитию заболеваний, связанных с митохондриальной дисфункцией, например, нейродегенеративных. Кроме того, митохондриальные АФК действуют как посредники при передаче сигнала в окислительно-восстановительных сигнальных путях и адаптивных сигнальных путях стресса (таких как гипоксия), контролируют пролиферацию и дифференцировку клеток [Sabharwal, Schumacker, 2014].

1.1.4 Активные формы кислорода

АФК представляют собой группу высокореактивных кислородсодержащих молекул, которые образуются в результате последовательного одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода [Song *et al.*, 2011]. Данная группа включает как свободные радикалы (например, супероксид-анион $O_2^{\bullet-}$ и гидроксильный радикал OH^{\bullet}), так и нерадикальные виды (такие как перекись водорода H_2O_2 и синглетный кислород 1O_2) [Chesa, Aran, 2020].

Супероксид-анион радикал ($O_2^{\bullet-}$) генерируется преимущественно в митохондриальной электрон-транспортной цепи вследствие утечки электронов, главным образом из комплексов I и III. Образующийся супероксид-анион служит предшественником для целого каскада других реактивных соединений. В результате ферментативной дисмутации, катализируемой супероксиддисмутазой (СОД), $O_2^{\bullet-}$ превращается в пероксид водорода (H_2O_2). H_2O_2 , не являясь свободным радикалом, обладает значительной стабильностью и способностью к диффузии через клеточные мембраны, что позволяет ему функционировать в качестве ключевого вторичного мессенджера, участвующего в передаче редокс-сигналов и регуляции таких процессов, как пролиферация, дифференцировка и апоптоз. Однако в присутствии ионов переходных металлов, прежде всего железа (Fe^{2+}) и меди (Cu^+), H_2O_2 вступает в реакцию Фентона, в ходе которой образуется

гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$) – наиболее реакционноспособная и, следовательно, наиболее опасная из АФК. Чрезвычайно высокая реакционная способность $\bullet\text{OH}$ обуславливает его немедленное взаимодействие с любыми биомолекулами в непосредственной близости от места образования, что приводит к их неспецифическому и необратимому повреждению [Sikder *et al.*, 2025].

В нормальных физиологических условиях клетка поддерживает редокс-гомеостаз за счет сложной многоуровневой антиоксидантной системы. Эта система включает ферменты, такие как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза, а также низкомолекулярные антиоксиданты, например, глутатион, витамины Е и С. Однако, когда скорость генерации АФК начинает превышать способность их нейтрализации антиоксидантной системой, возникает состояние окислительного стресса [Ansari *et al.*, 2025]. Причинами такого дисбаланса могут быть как эндогенные факторы, такие как дисфункция митохондрий или активация NOX-ферментов в ответ на воспаление, так и экзогенные воздействия, включая ионизирующее излучение, метаболизм ксенобиотиков или действие прооксидантных соединений [Sikder *et al.*, 2025].

1.1.5 Апоптоз

Апоптоз, или программируемая клеточная гибель, представляет собой фундаментальный биологический процесс, играющий ключевую роль в поддержании гомеостаза многоклеточных организмов. В отличие от некроза, который является патологической формой клеточной гибели, апоптоз — это генетически контролируемый процесс, характеризующийся строго определенными биохимическими и морфологическими изменениями. На первом этапе происходит индукция апоптогенных сигналов, запускающих программу гибели. Затем активируются ключевые проапоптотические регуляторы, инициирующие каскадную активацию семейства цистеиновых протеаз - каспаз. Активированные эффекторные каспазы осуществляют избирательный протеолиз критических клеточных субстратов, что приводит к структурной перестройке внутриклеточных органелл. Завершающими событиями являются фрагментация клетки на мембраносвязанные апоптотические тельца и экспрессия на их поверхности

молекулярных маркеров, обеспечивающих распознавание и поглощение фагоцитирующими клетками [Савицкая, Онищенко, 2015].

Регуляция апоптоза осуществляется через два основных пути: внешний (рецептор-опосредованный) и внутренний (митохондриальный). Внешний путь апоптоза, также известный как рецептор-опосредованный, инициируется внеклеточными сигналами, которые передаются через специфические рецепторы на поверхности клетки. Ключевыми медиаторами этого пути являются рецепторы семейства TNF (фактора некроза опухоли). Связывание тримерных лигандов (например, FasL или TRAIL) с соответствующими рецепторами "смерти" приводит к тримеризации самих рецепторов и образованию мультибелкового комплекса, который служит платформой для активации инициаторных каспаз - в первую очередь, каспазы-8 и каспазы-10 [Nössing, Ryan, 2023].

Внутренний путь активируется в ответ на внутриклеточные стрессовые сигналы, включая повреждение ДНК, окислительный стресс и нарушение клеточного цикла. Ключевым событием внутреннего пути является повышение проницаемости внешней митохондриальной мембраны, регулируемое белками семейства Bcl-2. Белки семейства Bcl-2 включают как проапоптотические (Bax, Bad), так и антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-xL) представители. При активации внутреннего пути проапоптотические белки вызывают высвобождение из митохондрий цитохрома C и других факторов. Цитохром C в цитозоле связывается с белком Araf-1, формируя апоптосому - многобелковый комплекс, активирующий каспазу-9. Оба пути - внешний и внутренний - сходятся на активации эффекторных каспаз (-3, -6, -7), которые осуществляют протеолиз ключевых клеточных белков, приводя к необратимой гибели клетки [Edlich *et al.*, 2011].

1.2 Современные проблемы и тенденции антимикробной терапии

1.2.1 Основные причины возникновения лекарственной резистентности

Использование антимикробных препаратов – это основной способ лечения инфекционных заболеваний человека, животных и растений. Открытие пенициллина в 1928 году положило начало «золотой эре» антибиотиков, пик которой пришелся на 50-е годы того же столетия [Hutchings *et al.*, 2019]. В эти годы

наблюдалось большое число открытий новых антимикробных агентов, антибиотики стали широко применяться для лечения инфекционных болезней.

При этом частое и бесконтрольное применение антибиотиков привело к появлению штаммов микроорганизмов устойчивых к таким препаратам. Вследствие появления устойчивости к противомикробным препаратам (УПП) снижается эффективность и повышается стоимость лечения инфекционных заболеваний, а также увеличивается риск летального исхода [ВОЗ. Устойчивость к противомикробным препаратам, 2020]. В связи с этим Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) характеризует УПП как глобальную угрозу здоровью и развитию человека.

Резистентность бактерий к антимикробным препаратам возникает на генном уровне: в результате мутаций, вертикального (в результате деления) и горизонтального (передача плазмид, несущих ген устойчивости) переноса генов [Schrader *et al.*, 2020]. Устойчивость может возникать не только к одному конкретному соединению, но и к целому классу антимикробных агентов. Например, устойчивость к тетрациклину может вызвать резистентность к окситетрациклину, доксициклину и миноциклину [Chopra, Roerts, 2001]. Кроме того, иногда возникают и мультирезистентные штаммы (устойчивые к различным классам антибиотиков). Одним из наиболее известных примеров таких микроорганизмов является золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*). Эти грамположительные бактерии достаточно быстро теряют чувствительность к антимикробным препаратам. Так широко известен метициллин-резистентный штамм *S. aureus* (MRSA), устойчивый к одному из наиболее обширных классов антибиотиков - β -лактамов [Науменко, Розова, 2007].

Широкое применение антибиотиков в сельском хозяйстве является одним из основных источников лекарственно устойчивых микроорганизмов, т.к. применяемые в этой области антимикробные агенты структурно похожи на препараты, используемые в клинике [Zaman *et al.*, 2017]. Также резервуаром антибиотикорезистентности являются медицинские учреждения. В условиях постоянного применения антимикробных препаратов, возбудители инфекций,

довольно быстро приобретают к ним устойчивость. Источником заражения может быть, как сама среда, окружающая пациентов, так и медицинский персонал. Таким образом, внутрибольничная инфекция – это разновидность инфекции, которая распространяется в различных больничных условиях, и приводит ко многим серьезным заболеваниям (например, пневмония, инфекция мочевыводящих путей, гастроэнтерит, и послеродовая лихорадка) и вызывает более высокую смертность, чем внебольничная инфекция [Xia *et al.*, 2016]. На сегодняшний день одними из наиболее устойчивых к антибиотикам возбудителей внутрибольничных инфекций считаются *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter sp.*, иначе называемые как ESKAPE патогены [Mulani *et al.*, 2019]. Эти микроорганизмы, а также некоторые грибы, например, *Candida albicans*, способны образовывать биопленки. Биопленки – это особая форма микробных сообществ, образованная микробными клетками и внеклеточным полимерным матриксом, который содержит в себе экзополисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. В такой форме микроорганизмы более устойчивы к воздействию антибиотиков и иммунной системы организма-хозяина [Rabin *et al.*, 2015]. Лечение многих бактериально-ассоциированных заболеваний, таких как эндокардит, стоматологический кариес, инфекции среднего уха, остеомиелит и хронические инфекции легких у больных муковисцидозом осложняется из-за образования биопленок. Так для борьбы с микробными биопленками необходимы дозы антибиотиков в 10-100 раз превышающие дозы, применяемые для ингибирования роста планктонных бактерий [Simões *et al.*, 2021].

В связи с этим, в настоящее время используются альтернативные методы лечения инфекционных заболеваний такие как пассивная иммунизация, фаготерапия (использование бактериофагов), комбинированная терапия (одновременное использование антибиотиков и бактериофагов) и др. Кроме того ведется поиск и создание новых противомикробных соединений [Hutchings *et al.*, 2019].

1.2.2 Современные подходы к созданию антимикробных агентов

В настоящее время существует несколько подходов к созданию и разработке новых противомикробных препаратов. Одним из таких подходов является модификация известных антимикробных соединений. Модификации позволяют повысить эффективность исходной молекулы (в том числе и против резистентных штаммов возбудителей) и/или снизить ее токсичность [Terreni *et al.*, 2021]. Так производное тетрациклиновых антибиотиков, Эравациклин, сохранив фармакофор, характерный для тетрациклинов, преодолевает основной механизм устойчивости к данному классу антибиотиков за счет некоторых структурных изменений, в результате чего эффлюксные насосы не распознают данную молекулу [Zaman *et al.*, 2017]. Полученное Raynaud с соавторами [Raynaud *et al.*, 2019] производное Бензимидазола высокоэффективно для лечения инфекций, вызванных нетуберкулезными микобактериями *Mycobacterium abscessus*.

Возрастающий интерес в области изучения геномов как человека, так и других организмов (в том числе и прокариотических) открывает новые возможности поиска вероятных сайтов-мишеней. Так мишенью могут являться гены, экспрессия которых необходима для выживания бактерий [Stephens *et al.*, 2020]. Поэтому многими учеными ведется разработка молекул-ингибиторов этих генов или их продуктов.

Одним из известных примеров этого подхода является разработка LpxC ингибиторов. LpxC – важный фермент в процессе биосинтеза липида А, который заякоривает молекулу липополисахарида в мембране грамотрицательных бактерий, при этом он является эндотоксином [Raetz, Whitfield, 2002]. Данная мишень перспективна, поскольку присутствует только в клетках бактерий. Предполагается, что ингибиторы LpxC будут безопасны в отношении эукариот [Kurasaki *et al.*, 2016]. Однако ни один продукт не прошел дальше первой фазы клинических испытаний из-за высокой токсичности. Основная причина этих неудач в непредусмотренном связывании активной молекулы с мишенями в клетках организма-хозяина, что приводит к нежелательным побочным эффектам [Theuretzbacher *et al.*, 2020].

Также внимание исследователей привлекают антимикробные натуральные, полусинтетические пептиды и пептидомиметики. Антимикробные пептиды встречаются во многих живых организмах, где они играют важную роль во врожденном иммунитете. В природе эти пептиды довольно разнообразны, содержат обычно менее 100 аминокислотных остатков (чаще положительно заряженных, таких как лизин, аргинин, гистидин и гидрофобных) [Jenssen *et al.*, 2006]. Обычно воздействие антимикробных пептидов приводит к нарушению мембранного потенциала, изменению проницаемости мембран, затем к лизису бактериальных клеток и их смерти [Browne *et al.*, 2020]. Создание полусинтетических антимикробных пептидов и пептидомиметиков позволило решить проблемы короткого периода полувыведения *in vivo* и высокой токсичности, которые имелись у их природных аналогов [Mahlapuu *et al.*, 2016]. В настоящее время существует десять коммерчески доступных противомикробных препаратов на основе пептидов, среди которых Полимиксин В [Zavascki *et al.* 2007], Ванкомиин [Patel *et al.*, 2020], Колистин [Li *et al.*, 2006] и другие [Kohanski *et al.*, 2010].

Одна из трудностей в создании новых препаратов – это большой объем исследований, доклинических и клинических испытаний. Процесс поиска новых применений существующих лекарств, репрофилирование лекарств, позволяет обойти большую часть этих стадий. Для существующих и применяющихся препаратов уже проведены фармакокинетические, фармакодинамические и токсикологические исследования, поэтому необходимо только подтверждение их эффективности. Но, как правило, антимикробный эффект таких соединений проявляется в концентрациях, значительно превышающих терапевтические дозы. В связи с этим возникает опасность проявления высокой токсичности и нежелательных побочных эффектов. Права интеллектуальной собственности и патенты также осложняют процесс репрофилирования лекарств. Поэтому до сих пор не было репрофилировано ни одно лекарственное средство для использования его в качестве антибактериального препарата [Frha, Brown, 2019].

1.3 Фосфониевые соли как биологически-активные соединения

1.3.1 Общая характеристика фосфониевых солей

Четвертичные фосфониевые соли (ЧФС)– это фосфорорганические соединения, которые содержат в себе положительно заряженный атом фосфора, ковалентно связанный с органическими радикалами через Р-С связь [Пурдела, Вылчану, 1972]. Фосфониевые соли находят применение во многих областях исследований, таких как катализ, органический синтез и медицинская химия. Кроме того, положительно заряженные фосфониевые соли могут использоваться в качестве ингибиторов коррозии [Nahlé *et al.*, 2018] или дезинфектантов в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и медицине [Noroози-Shad *et al.*, 2022]. Четвертичные фосфониевые соединения проявляют широкий спектр биологической активности, а именно антибактериальной [Akshay, Karpagam, 2017; Xue *et al.*, 2015; Tsa *et al.*, 2018], цитотоксической [Zielonka *et al.*, 2017; Millard *et al.*, 2010], противовирусной [Xue, Xiao, 2016], противопаразитарной [Спивак с соавт., 2016; Tomoo *et al.*, 2001; Alkhaldi *et al.*, 2016], антиоксидантной [Антоненко с соавт., 2008] и наоборот приводящей к увеличению уровня активных форм кислорода в клетках [Kumari *et al.*, 2019].

Широко известно свойство фосфониевых солей проникать через мембрану в ответ на трансмембранный потенциал [Ross *et al.*, 2005]. В 1969 г. В. Скулачев с коллегами опубликовали статью, в которой было продемонстрировано существование $\Delta\Psi_m$. В этой работе было показано, что липофильный катион дибензиламмония накапливается в матриксе митохондрий в ответ на $\Delta\Psi_m$ [Lieberman *et al.*, 1969]. В последствие группа Скулачева в своих исследованиях стала использовать катион метилтрифенил фосфония (1) (Рисунок 1), который легче проникал и накапливался в митохондриях. Эти исследования показали многообещающий потенциал трифенил фосфониевых катионов (ТФФ⁺) для митохондриального нацеливания.

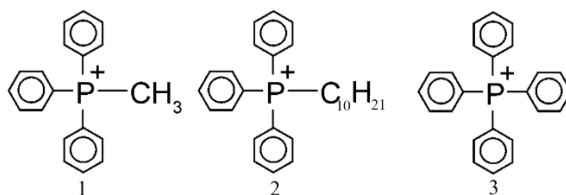


Рисунок 1 – Структурные формулы фосфониевых солей (1-3).

Липофильные катионы, такие как ТФФ⁺ заряжены положительно, липофильны, а также имеют большой ионный радиус, что позволяет им легко проникать через липидный бислой мембраны в митохондрии [Oyewole, Birch-Machin, 2015]. Механизм проникновения через фосфолипидный бислой объясняется следующим образом: липофильные катионы адсорбируются на гидрофильной поверхности мембраны, затем быстро перепрыгивают через гидрофобное ядро мембраны, прежде чем десорбироваться с другой стороны липидного бислоя. Степень этого поглощения описывается уравнением Нернста (1).

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{in}}{c_{out}}, \quad (1)$$

где R – универсальная газовая постоянная,

T – температура (К),

n — валентность заряженных частиц,

F — постоянная Фарадея,

c_{out} и c_{in} — концентрации частиц по обе стороны (внешней и внутренней) заряженной мембраны с потенциалом $\Delta\Psi$.

1.3.2 Митохондриально-направленные фосфониевые соли

Для достижения митохондрий липофильные катионы должны пройти и через цитоплазматическую и митохондриальную мембраны. Обе мембраны заряжены отрицательно. Поэтому вещества поэтапно накапливаются сначала в цитозоле (их концентрация увеличивается в 5-10 раз), а затем концентрируются (в 100-500 раз) в матриксе митохондрий за счет более отрицательного $\Delta\Psi_m$ (Рисунок 2).

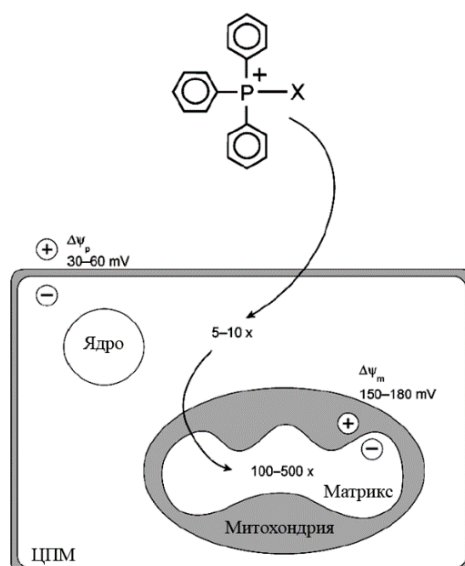


Рисунок 2 – Поглощение трифенилфосфониевых производных клеткой за счет отрицательного мембранного потенциала [Ross *et al.*, 2005].

Способность липофильных катионов проникать через мембраны и накапливаться в митохондриях дает возможность осуществить направленную доставку биоактивного соединения, ковалентно присоединенного к ТФФ⁺. Было показано, что скорость проникновения через мембрану зависит от липофильности молекулы. Так поглощение митохондриями децил трифенилфосфония (2) (Рисунок 1) происходит гораздо быстрее, чем метил трифенилфосфония (1) (Рисунок 1) [Ross *et al.*, 2008]. Влияние заряда молекул, присоединенных к липофильным катионам, рассмотрели Finichiu с коллегами. Авторы сообщают, что поглощение митохондриями зависит не только от $\Delta\psi_m$, но и от градиента pH. В статье также подробно описывается поведение положительно и отрицательно заряженных молекул, присоединенных к ТФФ⁺. Так было показано, что включение слабой кислоты значительно усиливает поглощение митохондриями. Причем при включении слабых оснований, поглощение митохондриями снижается [Finichiu *et al.*, 2013].

В подробном обзоре Zielonka с соавторами описана типичная молекула с различными функциональными группами, присоединенными к ТФФ⁺ через алкильную или другую линкерную цепь, где в зависимости от длины линкерной

алкильной цепи, варьируется липофильность, клеточное поглощение и место митохондриальной секвестрации (матрица или мембрана) (рисунок 3) [Zielonka *et al.*, 2017]. Но в организме ТФФ+-лекарство будет распределяться по всем органам и тканям, концентрируясь в клетках с повышенным содержанием митохондрий. Варианты направленного введения активного вещества в целевые ткани предложены в обзоре Cairns с коллегами [Cairns *et al.*, 2015]. Здесь описывается стратегия пролекарства, в которой лекарство высвобождается из ТФФ+-носителя в определенных митохондриях под действием внешних (например, ультрафиолетовое излучение) или внутренних факторов. Кроме того, в 2004 г был описан способ доставки активных соединений в цитоплазму путем конъюгации с ТФФ+ через дисульфидную связь. ТФФ+ осуществляет перенос молекулы через цитоплазматическую мембрану в цитоплазму, где дисульфидная связь восстанавливается, в результате чего активная молекула высвобождается, а ТФФ+ переходит в митохондрии [Filipovska *et al.*, 2004].

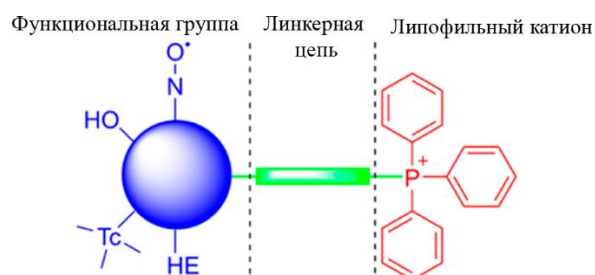


Рисунок 3 – строение типичной молекулы митохондриально-направленных агентов по Zielonka с соавторами.

Свойство фосфониевых солей проникать в митохондрии находит применение во многих областях. Наиболее подробно изучены митохондриально-направленные антиоксиданты MitoQ (4) (Рисунок 4) и SkQ (5) (известные как ионы Скулачева) (Рисунок 4). MitoQ – производное убихинона, которое ковалентно присоединено к катиону трифенилфосфония через алифатическую углеродную цепь. Это соединение обладает антиоксидантными свойствами, предотвращая перекисное окисление липидов и окислительное повреждение митохондрий [Wang *et al.*, 2023; Kelso *et al.*, 2001]. SkQ – семейство митохондриально-направленных

антиоксидантов, содержащих в своем составе пластохинон. SkQ1 представляет собой катион трифенилфосфония, соединенный с пластохиноном через децильную линкерную цепь [Skulachev *et al.*, 2023]. SkQ1 является действующим веществом глазных капель Визомитин®, применяющихся при лечении синдрома сухого глаза, а также входит в состав антивозрастной сыворотки MitoVitan®.

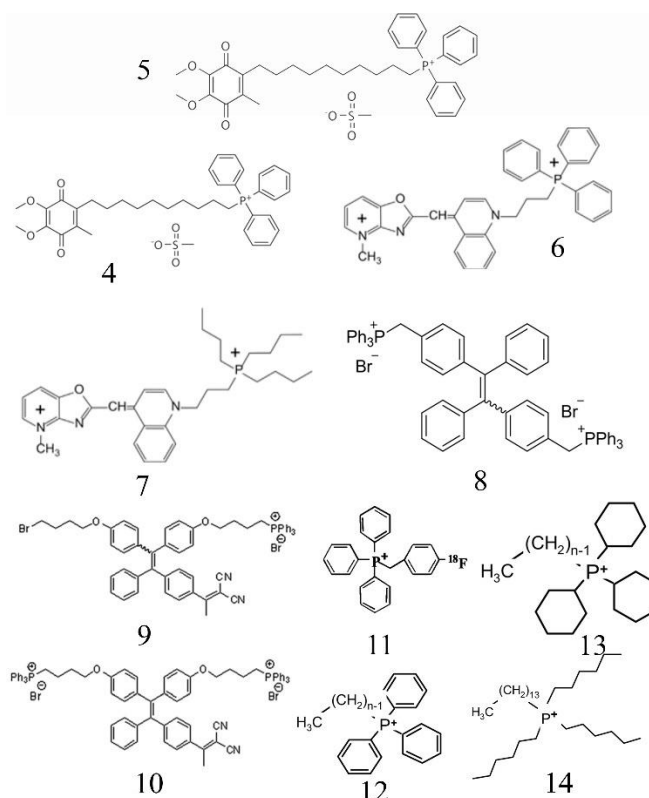


Рисунок 4 – Структурные формулы фосфониевых солей (4-14).

Производные ТФФ⁺ также могут использоваться для определения мембранного потенциала, в том числе митохондрий. Одними из первых работ в этой области были исследования Камо с соавторами. В своих работах они использовали серию гомологов (Phe)₃-P⁺-(CH₂)_n-CH₃ (n = 0-4) и тетрафенилфосфоний (3) (Рисунок 1) [Камо *et al.*, 1979; Demura *et al.*, 1985; Demura *et al.*, 1987]. Для измерения мембранного потенциала использовали электрод, чувствительный к этим ионам. Исследование показало, что наиболее близкое к реальному значению мембранного потенциала продемонстрировало измерение с использованием катиона метил трифенилфосфония (1) (Рисунок 1), однако он дольше проникает через мембрану. О флуоресцентных ΔΨ_m – зависимых зондах

на основе фосфониевых солей сообщают и Šarić с коллегами [Šarić *et al.*, 2017]. Авторами были получены производные трифенилфосфония (6) (Рисунок 4) и тригексилфосфония (7) (Рисунок 4), обладающие низкой цитотоксичностью и высокой специфичностью к окрашиванию митохондрий, кроме того, вещества не оказывали серьезного влияния на пролиферацию и дыхательную активность клеток.

Для визуализации митохондрий был получен $\Delta\Psi_m$ – чувствительный зонд в результате конъюгации фрагмента тетрафенилэтена, архетипического люминогена АПЕ с двумя трифенилфосфониевыми группами (8) (Рисунок 4), который показал себя как высокоселективный и быстроокрашивающий краситель [Leung *et al.*, 2013]. Накопление другого флуоресцентного производного моно- (9) (Рисунок 4) и дикатионного (10) (Рисунок 4) ТФФ⁺ в раковых клетках приводило к снижению $\Delta\Psi_m$ и повышенной генерации АФК. Причем монокатионный аналог проявлял цитотоксичность лишь при облучении светом. Дикатионное производное приводило к деполяризации митохондрий и обладало цитотоксичностью даже в темноте [Zhang *et al.*, 2015]. Фосфониевые соли возможно использовать даже для визуализации целых органов. Так в обзоре Kim с соавторами рассматриваются производные трифенилфосфония с радиоактивной меткой в качестве средств визуализации миокарда для позитронно-эмиссионной томографии [Kim, Min, 2016]. Из-за того, что липофильный катион ТФФ⁺ направлено проникает в митохондрии, он способен селективно накапливаться в органах с повышенным содержанием митохондрий, например, в мышечных тканях миокарда. Одним из примеров таких фосфониевых солей является ¹⁸F-фторбензилтрифенилфосфоний (¹⁸F-FBnTP) (11) (Рисунок 4). Оптимальный баланс делокализованного заряда и липофильности делает это соединение достаточно точным и чувствительным для определения изменений в митохондриальном мембранном потенциале [Madar *et al.*, 2007].

Как было сказано выше, $\Delta\Psi_m$ тесно связан с окислительным фосфорилированием, происходящим в митохондриях. Неудивительно, что часто митохондриальные зонды оказывают влияние на функцию митохондрий (дыхание,

синтез АТФ). В работе Trnka с соавторами было показано, что гидрофобные катионы ТФФ⁺ негативно влияют на $\Delta\Psi_m$ и активность дыхательной цепи. Снизить подобный эффект можно уменьшением длины линкерной цепи или добавлением функциональной гидрофильной группы [Trnka *et al.*, 2015].

Часто фосфониевую группу используют для нацеливания противоопухолевых агентов на митохондрии. Встречаются также и работы, в которых модифицируют сложные комплексы и супрамолекулярные системы доставки. Так, например, в работе Solomon с коллегами описывается доставка Паклитаксела (15) (Рисунок 5) (известного цитотоксического противоракового препарата) опосредованная липосомами, которые были модифицированы стеарилтрифенилфосфониевыми группами. Такая доставка смогла улучшить эффективность паклитаксела на устойчивой к нему линии Ovar-3 [Solomon *et al.*, 2013]. Другим примером являются модифицированные трифенилфосфонием производные Доксорубина (16) (Рисунок 5), которые проникают в митохондрии и увеличивают селективность противоопухолевого препарата [Han *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2017]. Доксорубин – известный химиотерапевтический препарат, используемый для лечения многих видов рака, способен интеркалироваться в пары оснований ДНК, вызывая разрыв нитей ДНК и ингибирование синтеза как ДНК, так и РНК (17) (Рисунок 5) [Sritharan, Sivalingam, 2021]. Нескольким группам авторов с помощью ТФФ⁺-группы удалось добиться митохондриального нацеливания АФК чувствительных систем. Таким образом, пролекарство, загруженное в наночастицы, попадает в митохондрии и под действием АФК высвобождается, вызывая митохондриальную дисфункцию [Zhang *et al.*, 2022; Xi *et al.*, 2021].

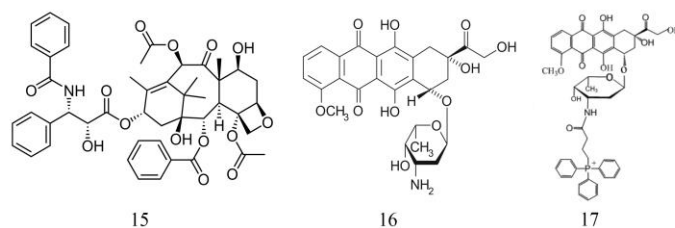


Рисунок 5 – Известные противоопухолевые препараты и их производные (15-17).

Обычно в качестве молекулярного вектора для доставки различных активных соединений используются производные трифенилфосфония. В статье Рокитской с соавторами было проведено сравнение способности алкилпроизводных трифенилфосфония (12) (Рисунок 4), трициклогексилфосфония (13) (Рисунок 4) и тригексилфосфония (14) (Рисунок 4) проникать через мембраны. В данной работе было показано, что ароматичность не является обязательным условием для проникновения через мембраны [Rokitskaya *et al.*, 2021].

1.3.3 Цитотоксические свойства фосфониевых солей

Как было сказано ранее, $\Delta\Psi_m$ образуется в результате работы ЭТЦ, за счёт электрохимического градиента протонов. В клетках карциномы часто наблюдается повышенный митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$). Например, в клетках карциномы толстой кишки CX-1 $\Delta\Psi_m=163$ mV, а у эпителиальных клеток почки зеленой мартышки CV-1 $\Delta\Psi_m=104$ mV [Modica-Napolitano *et al.*, 2001]. В настоящее время пока нет полного понимания причин такого явления, однако есть несколько теорий, которые предполагают, что $\Delta\Psi_m$ раковых клеток может зависеть от различных факторов: генетических мутаций, затрагивающих митохондриальную функцию, активность онкогенов (MYC, AKT, RAS, BRAF) и снижения активности опухолевых супрессоров (таких как p53) [Begum, Shen, 2023]. Тем не менее, такое явление позволяет использовать липофильные катионы для селективного воздействия на раковые клетки. Действительно в литературе довольно часто встречаются работы, в которых сообщается о фосфониевых солях, которые эффективны в отношении опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [Dhanya *et al.*, 2017; Mansour *et al.*, 2022].

1.3.3.1 Механизм противоопухолевого действия фосфониевых солей

Понимание механизма действия соединений – важнейший этап в разработке и исследовании новых потенциальных цитотоксических агентов. Воздействие фосфониевых солей на митохондрии отмечают многие исследователи. Например, соединения, описанные Manetta с коллегами (18 и 19) (Рисунок 6) вызывали повреждение митохондрий, что было выявлено с помощью трансмиссионной электронной микроскопии [Manetta *et al.*, 1996]. Millard с соавторами провели

широкий скрининг более 10,000 соединений, в результате которого были выявлены вещества, IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) которых определялись в субмикромольных концентрациях. На *in vivo* модели было показано снижение роста опухоли у мышей по сравнению с препаратом паклитакселом, кроме того, не было выявлено гистологических аномалий и симптомов токсичности в течение лечения. Авторы продемонстрировали, что фосфониевые соли (20) (Рисунок 6) локализовались в митохондриях, в результате чего в клетках останавливался клеточный цикл независимо от статуса p53, наблюдалось снижение потребления кислорода и рост митохондриального супероксида. Известно, что белок p53 реагирует на повреждение ДНК и активирует ингибитор циклинзависимой киназы p21, который в свою очередь приводит к остановке клеточного цикла [Manic *et al.*, 2015]. С помощью протеомных исследований авторы выяснили, что соединения оказывали влияние на сигнальные пути роста и пролиферации [Millard *et al.*, 2010]. В другой работе обработка клеток (11-метокси-11-оксо-ундецил) трифенилфосфоний бромидом (21) (Рисунок 6) приводила к снижению массы митохондрий и $\Delta\Psi_m$, повышению уровня АФК и остановке клеточного цикла при переходе G1/S. В клетках отмечалось увеличение уровня белков p21 и p53 и индукция апоптоза [Dhanya *et al.*, 2017].

Несколько отличный механизм действия описали Иксанова с соавторами для трех фосфониевых солей на основе 3-гидроксипиридинового каркаса (22-24). Вещества также останавливали клеточный цикл на фазе G1 и вызывали апоптоз. Но несмотря на то, что при воздействии соединения (22) (Рисунок 6) наблюдалось повышение АФК в клетках и увеличение уровня каспазы 3, изменений в экспрессии Вах и Vcl-xL по сравнению с контролем не было выявлено, не изменялся и $\Delta\Psi_m$. В связи с этим, авторы предполагают, что апоптоз запускается по внешнему пути. Соединение (23) (Рисунок 6) с одной фосфониевой группой не приводило к снижению $\Delta\Psi_m$, но наблюдалось увеличение АФК и сверхэкспрессия ВАХ и каспазы 3 (эффektorной каспазы, осуществляющей апоптоз). Соединение (24) (Рисунок 6), имеющее бис-фосфониевый фрагмент в своей структуре, наоборот снижало $\Delta\Psi_m$, что приводило к высвобождению цитохрома С в межмембранное

пространство и индукции апоптоза за счет гиперэкспрессии Вах и каспазы 3 [Iksanova *et al.*, 2018].

Еще несколько работ демонстрируют митохондриальное нацеливание фосфониевых солей. Вещества приводили к снижению $\Delta\Psi_m$, дыхательной функции митохондрий, запускали апоптоз по внутреннему пути [Gardner *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2015; Rideout *et al.*, 1994]. ТФФ+ производное (25) (Рисунок 6) *in vivo* приводило к индукции апоптоза в клетках. Кроме того, воздействие этого вещества приводило к фрагментации тканевой ДНК, подавлению гена Bcl-2 и повышению маркеров Вах, каспазы 3 и p53, а также снижению уровня TNF- α (фактора некроза опухоли α , являющегося медиатором воспалительных и иммунных функций [Fitzgerald *et al.*, 2001]) в тканях печени [Mansour *et al.*, 2022]. В некоторых работах авторы предполагают, что цитотоксическое действие соединений на клетки HeLa может быть связано с взаимодействием вещества с ДНК. Xie с соавторами показали методом РАМАН-спектроскопии, что ТФФ производные (26) (Рисунок 6) обладали сродством к ДНК [Xie *et al.*, 2008].

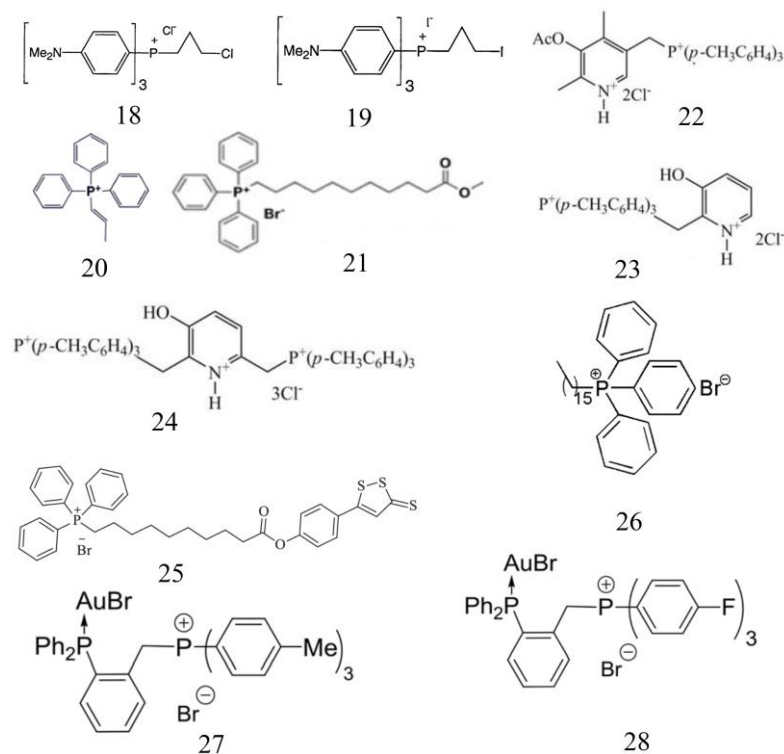


Рисунок 6 – Структурные формулы фосфониевых солей, обладающих противоопухолевой активностью (18-28).

1.3.3.2 Взаимосвязь «структура-активность» в рядах фосфониевых солей с противоопухолевой активностью

Основным фактором, влияющим на цитотоксичность соединений, является их липофильность. Например, в работе Manetta с соавторами были исследованы несколько производных фосфониевых солей. Из них хлорид 3-хлорпропилтрис(4-диметиламинофенил)фосфония (18) и йодид 3-йодпропилтрис(4-диметиламинофенил)фосфония (19) (Рисунок 6) были наиболее липофильными и проявляли лучший цитотоксический эффект в отношении клеточной линии карциномы яичников человека ($IC_{50} = 80$ нМ и 16,7 нМ соответственно) [Manetta *et al.*, 1996]. Кроме липофильности, на эффективность соединений влияет и распределение заряда. Так в работе Rousselle с коллегами описываются комплексы золота. В результате присоединения к ним фосфониевой группы, улучшались растворимость и биодоступность комплексов. В этом исследовании было отмечено, что наилучший антипролиферативный эффект достигается, когда положительный заряд фосфония делокализован на нескольких ароматических заместителях или, когда эти ароматические кольца замещены электронодонорными группами ($IC_{50} \approx 0.4$ мкМ) (27) (Рисунок 6). Соответственно обратный эффект наблюдается при присоединении электроноакцепторных групп (в данной работе приводится пример F в пара-положении бензольного кольца) (28) (Рисунок 6) [Rousselle *et al.*, 2021]. Схожую зависимость продемонстрировали Chen с соавторами [Chen *et al.*, 2017].

На основе имеющихся данных по зависимости активности от структуры вещества некоторыми группами ученых были разработаны различные системы скрининга *in silico* на основе математических моделей «количественная взаимосвязь структура-активность» QSAR (quantitative structure of activity relationship). Например, модель QSAR предложенная Kumer с соавторами учитывает физико-химические параметры и термодинамические свойства веществ, включающие трехмерную структуру, длину связи, атомные заряды, полную энергию, свободную энергию, энтропию, дипольный момент, энергию образования, энергию связи, электростатическую энергию и ядерную энергию. Молекулярные дескрипторы QSAR должны рассчитывать заряд, площадь

поверхности, объем, энергию гидратации, Log P, преломление, поляризуемость и молекулярную массу. Все эти параметры позволяют спрогнозировать химические свойства и биологическую активность молекул [Kumer *et al.*, 2019]. Модель прогнозирования токсичности на клеточной линии лейкемии крыс (IPC-81) была продемонстрирована Ma с коллегами. Цитотоксичность веществ в данном случае зависела от пространственной структуры, размера и гидрофобности катионов [Ma *et al.*, 2015].

1.3.4 Антимикробная активность фосфониевых солей

Как уже было сказано ранее, фосфониевые соли способны проникать в клетку в ответ на мембранный потенциал ($\Delta\psi$) [Lieberman *et al.*, 1969]. В бактериальной клетке $\Delta\psi$ динамичен и является источником свободной энергии, регулируя широкий спектр бактериальной физиологии и поведения, например, гомеостаз pH, мембранный транспорт, подвижность, устойчивость к антибиотикам, деление клеток и зондирование окружающей среды [Benarroch, Asally, 2020]. Например, Lo с соавторами показали зависимость $\Delta\psi$ от pH. Так у кишечной палочки $\Delta\psi = -140 \pm 14$ мВ при внешнем pH 7,0 (pH_{ex}), уменьшаясь до -85 ± 10 мВ при pH_{ex} 5,0 [Lo *et al.*, 2007]. По сравнению с бактериальным мембранным потенциалом, потенциал цитоплазматической мембраны (ЦПМ) эукариотических клеток ниже ($-30 - -60$ mV) [Ros *et al.*, 2005], за счет этого, можно добиться селективности антимикробного действия фосфониевых солей.

1.3.4.1 Спектр антимикробного действия фосфониевых солей

В целом, фосфониевые соли обладают широким спектром антимикробной активности, хотя преимущественно действуют на грамположительные бактерии. Некоторые фосфониевые соли [Strobykina *et al.*, 2021], в том числе дикатионные и соли на полимерном носителе [Choi *et al.*, 2011] практически не оказывают антимикробного действия на грамотрицательные бактерии.

Однако в ряде исследований сообщается о соединениях, демонстрирующих более высокую эффективность против грамотрицательных бактерий. Например, был получен каучук, модифицированный ТФФ+ [Li *et al.*, 2013], который показал умеренную активность в большей степени на штамме кишечной палочки. В другой

работе фосфониевые соли проявили активность лишь на бактериях *P. aeruginosa*, при этом, не оказывая практически никакого воздействия на *E. faecalis*, *S. aureus* и *E. coli* (29) (Рисунок 7) [Kodjo *et al.*, 2022]. Chavarria с соавторами сообщают о трифенилфосфониевых производных фитохимического происхождения (30) (Рисунок 7), которые обладают высокой антимикробной активностью в отношении бактерий *S. aureus* (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) < 0.25 мкг/мл), при этом не проявляют противогрибковых свойств, и не эффективны в отношении грамотрицательных бактерий [Chavarria *et al.*, 2023].

Некоторые соединения одинаково воздействуют на обе группы бактерий. Так триизобутил(метил)фосфоний тозилат (31) и тригексил(тетрадецил)фосфония бис-2,4,4-(триметилпентил)-фосфинат (32) (Рисунок 7) в концентрациях 0,54 г/мл показали антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* (диаметр зон ингибирования 32 и 26 мм соответственно) и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (диаметр зон ингибирования 24 и 21 мм соответственно) [Mukherjee *et al.*, 2012]. Описанные Chan с коллегами производные конъюгированных олигоэлектролитов со стильбен-конъюгированным сегментом и боковыми группами трифенилфосфония (33) (Рисунок 7) обладают высокой антимикробной активностью как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (МИК_{*S. aureus*} = 1 мкг/мл, МИК_{*E. coli*} = 2 мкг/мл) [Chan *et al.*, 2023]. Kanazawa с соавторами в серии работ также сообщают о фосфониевых солях, которые воздействуют на грамположительные и грамотрицательные бактерии [Kanazawa *et al.*, 1993; Kanazawa *et al.*, 1994].

Очевидно, что причина, по которой фосфониевые соли хуже действуют на грамотрицательных бактерий, заключается в строении клеточной стенки. У этих бактерий две мембраны: наружная и внутренняя (плазматическая), которые разделены пептидогликановым слоем, находящимся в периплазматическом пространстве. Плазматическая мембрана состоит из фосфолипидов, как и большинство бактериальных и эукариотических мембран. Строение наружной мембраны иное: цитоплазматический мембранный листок не отличается от внутренней мембраны и также состоит из фосфолипидов, а экзоплазматический,

как правило, образован липополисахаридами [Пиневиц 2006; Khairalla, Brand, 2021]. По всей видимости, наружная мембрана является барьером для большинства липофильных катионов, которые преимущественно адсорбируются на поверхности и не проникают внутрь клетки [Choi *et al.*, 2011].

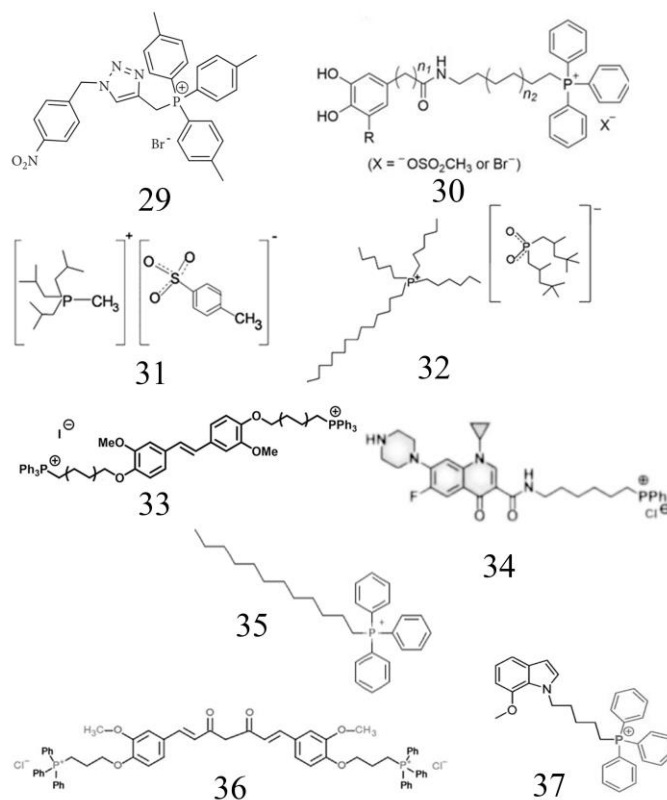


Рисунок 7 – Структурные формулы фосфониевых солей, обладающих антимикробной активностью (29-37).

Показательным примером для этого феномена является работа Kang с соавторами, которые получили Ципрофлоксацин, модифицированный ТФФ+ (34) (Рисунок 7). Известно, что сам Ципрофлоксацин обладает широким спектром действия и эффективен против грамотрицательных бактерий (МИК в отношении *E. coli* = 0,004 мкг/мл). Однако при введении фосфониевой группы, вещество потеряло активность в отношении как резистентных, так и чувствительных штаммов кишечной палочки (МИК = 89 и 5,56 мкг/мл соответственно). Несмотря на это, модифицированный ТФФ ципрофлоксацин продемонстрировал высокую активность в отношении грамположительных штаммов, особенно MRSA. Так МИК ципрофлоксацина в отношении MRSA = 128 мкг/мл, а МИК модифицированного

ТФФ ципрофлоксацина в отношении того же штамма = 2,78 мкг/мл [Kang *et al.*, 2020].

Есть примеры работ, где фосфониевые соли проявляют активность против микобактерий. Так митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 (5) (Рисунок 4) проявил антимикробную активность в отношении микобактерий туберкулеза (МИК = 1-2 мкМ), кроме того, активность на том же уровне проявляет схожая структура додецил трифенил фосфоний (35) (Рисунок 7), отличающийся от SkQ1 более длинной алкильной цепью и отсутствием пластохинона, присоединенного к этой цепи. МИК в отношении *Mycobacterium smegmatis* = 0.5–1 мкМ для обоих производных [Nazarov *et al.*, 2023]. ТФФ конъюгат куркумина MitoC (36) (Рисунок 7) тоже обладает активностью в отношении *M. smegmatis* (МИК=12,5 мкМ), но эта активность была на порядок ниже, чем в отношении грамположительных бактерий *S. carnosus* и *B. subtilis* (МИК = 1,5 и 2,5 мкМ соответственно) [Kumari *et al.*, 2019]. Аналоги индолилалкилтрифенилфосфония (37) (Рисунок 7) тоже оказывали бактериостатическое действие на *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* и проявляли бактерицидность в отношении *Mycobacterium bovis BCG* [Li *et al.*, 2017].

Некоторые фосфониевые соли демонстрируют противогрибковую активность. Так, например, алкилтрибутилфосфоний хлориды [P4 4 4 n]Cl (где n = 1, 3–8, 10, 12 или 14) обладают активностью в отношении конидий мицелиального гриба *Aspergillus nidulans*. Эффективность производных зависела от длины алкильного радикала и достигала максимума для тетрадецильного производного [P4 4 4 14]Cl (МИК и МФК = 0,011 мМ) [Petkovic *et al.*, 2012]. Другим примером является работа Chavarria с соавторами, в которой ТФФ+ производные проявили активность в отношении как грамположительных бактерий, так и грибов *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans var. Grubbi* [Chavarria *et al.*, 2023].

1.3.4.2 Механизм антимикробного действия фосфониевых солей

Несмотря на то, что изучению фосфониевых солей уделяется внимание уже много лет, нет четкого понимания их механизма действия. Многие авторы сообщают о различном и иногда даже противоречивом влиянии фосфониевых

солей на микроорганизмы. Предполагается, что механизм действия фосфониевых солей может быть схож с механизмом антимикробного действия катионных биоцидов, таких как четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), а именно они затрагивают цитоплазматическую мембрану бактерий и дрожжей, влияя на ее структурные и динамические свойства и приводя к ее разрушению. Общий механизм действия описывает Simões с коллегами в своем обзоре. Известно, что поверхность большинства бактериальных клеток заряжена отрицательно и часто стабилизирована присутствием двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} и Mg^{2+} . Поэтому положительно заряженные фосфониевые соли взаимодействуют с отрицательно-заряженными структурными белками. Затем фосфониевые соли взаимодействуют с ЦМП и проникают внутрь клетки, вызывая повреждение компонентов цитоплазмы, ингибируя ферменты, влияя на энергетические процессы, и в конце концов приводят к гибели клетки [Simões *et al.*, 2021].

В большинстве работ описывается нарушение ЦПМ при воздействии фосфониевых солей. Так Назаров с соавторами в серии работ описывают производные фосфониевых солей, способные вызывать деполяризацию ЦПМ бактерий, при этом не изменяя ее проницаемости [Nazarov *et al.*, 2020; Pavlova *et al.*, 2021]. В других исследованиях фосфониевые соли вызывали как деполяризацию, так и пермеабиллизацию бактериальной мембраны [Li *et al.*, 2017; Sommers *et al.*, 2022]. Однако существуют работы, где повреждение мембраны не является основным механизмом антимикробного действия. Согласно работе Стробыкиной с коллегами бактерицидный эффект веществ, в отличие от классических поверхностно-активных веществ, не был обусловлен нарушением целостности цитоплазматической мембраны бактерий [Strobykina *et al.*, 2021].

Кроме воздействия на ЦПМ бактерий, исследователи отмечают и внутриклеточные повреждения. Так в работе Тереховой с соавторами рассматриваются фосфониевые соли, которые продемонстрировали высокую антибактериальную активность в отношении грамположительной спорообразующей бактерии *B. subtilis* (МИК = 1 мкМ). На изолированных митохондриях крыс вещества продемонстрировали свойства разобщителей

[Terekhova *et al.*, 2021]. В другой работе Пугачев с коллегами продемонстрировали, что фосфониевые производные пиридоксина вызывают фрагментацию ДНК, а также изменяют структуру плазмидной ДНК. Авторы предполагают, что соединение взаимодействует с отрицательно заряженной плазмидной ДНК за счет катионной группы фосфония [Pugachev *et al.*, 2013]. MitoC (ТФФ+ конъюгат куркумина) приводит к увеличению уровня АФК в клетках [Kumari *et al.*, 2019].

1.3.4.3 Связь структура-активность в рядах фосфониевых солей с антимикробной активностью

В период 90-х годов зависимость антимикробных свойств фосфониевых солей от их структуры исследовали авторы Kanazawa, Ikeda, Endo. При изучении ряда солей с одной или двумя длинными алкильными цепями у атома фосфора было выявлено, что наибольшую антимикробную активность проявляли производные с двумя длинными алкильными цепями, оптимальная длина алкильной цепи содержала десять атомов углерода (38) (Рисунок 8). Для производных с одной длинной алкильной цепью, наиболее эффективным было вещество с октадецильным радикалом (39) (Рисунок 8). В целом, на антимикробную активность влияет гидрофобность молекулы, что обуславливается общей длиной алкильной цепи (так для обоих производных общая длина углеродной цепи составила 21 и 22 атомов углерода соответственно) [Kanazawa *et al.*, 1994]. Кроме того, авторы отмечают влияние ионной силы соли, свойств самосборки [Kanazawa *et al.*, 1995].

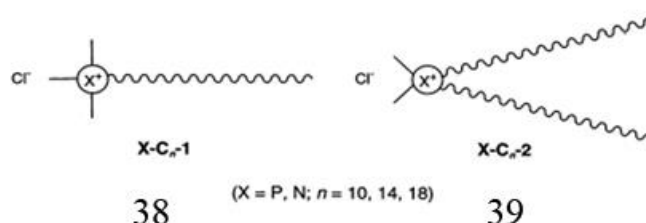


Рисунок 8 – Структуры фосфониевых солей, описанные Kanazawa с соавторами (38-39).

Значение длины алкильного радикала подтверждают и многие другие работы. Ермолаев с коллегами отмечают рост антимикробной активности с увеличением длины алкильного радикала (до 17 атомов углерода) (40) (Рисунок 9). Кроме того, авторы сообщают, что нет значительной разницы между противоионом бромидом и тетраборатом [Ermolaev *et al.*, 2021]. В другой работе была определена оптимальная длина цепи для алкилтрифенилфосфоний бромидов (41) (Рисунок 9) и алкилтрибутилфосфоний бромидов (42) (Рисунок 9) [Metelytsia *et al.*, 2022]. Среди производных были соли с октильным, децильным, и додецильным радикалом. Наиболее эффективными оказались соединения с длиной алкильной цепи в 10 и 12 атомов углерода (при значениях МИК в диапазоне 6,25–12,5 мкМ). Антимикробная активность фосфониевых солей терялась при уменьшении длины углеродной цепи меньше 8 атомов углерода и увеличение больше 12 атомов углерода. Таким образом, становится понятно, что невозможно максимально увеличить антимикробную активность молекулы, постоянно увеличивая ее гидрофобность.

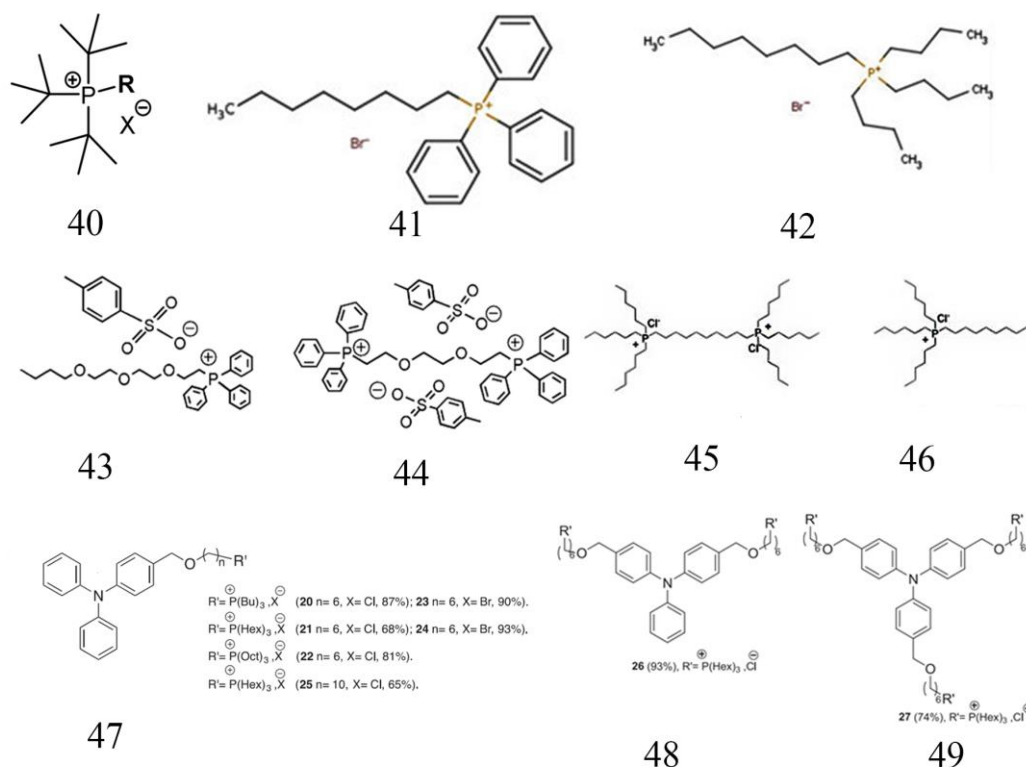


Рисунок 9 – Структурные формулы фосфониевых солей, обладающих антимикробной активностью (40-49).

В других работах кроме длины алкильного радикала, отмечают влияние других структурных особенностей. Пугачев с соавторами отметили роль кетальной защиты [Pugachev *et al.*, 2013]. Влияние метоксизаместителей отмечали Хасиятуллина с коллегами [Khasiyatullina *et al.*, 2019].

Число фосфониевых групп также влияет на антимикробную активность фосфониевых солей [Simões *et al.*, 2021]. Lei с соавторами были рассмотрены моно- и бисфосфониевые соли с разной длиной олигоэтиленгликолевой цепи (43-44) (Рисунок 9). Для данных соединений была показана слабая антимикробная активность в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Причем наименьшую активность продемонстрировало вещество с наибольшей длиной олигоэтиленгликолевой цепи (6.2 и 12.5 мг/мл для *S. aureus* и *E. coli* соответственно), а наибольшую – дикатионный аналог (МИК 1.5 и 3.1 мг/мл для *S. aureus* и *E. coli* соответственно) [Lei *et al.*, 2020].

В другой работе дикатионный аналог (45) (Рисунок 9) проявлял активность в несколько раз большую, чем монокатионный (46) (Рисунок 9). Так МБК в отношении *S. aureus* моно- и дикатионных фосфониевых солей составили 100 и 8 мкг/мл соответственно, а в отношении *E. coli* 1000 и 40 мкг/мл соответственно. Кроме того, дикатионное производное обладало широким спектром антибактериальной активности в отношении некоторых клинических изолятов, в том числе MRSA (МИК=0,8 мкг/мл), *P. aeruginosa* (МИК=20 мкг/мл) и грибов *C. albicans* (МИК=8 мкг/мл). Несмотря на значительную разницу в антимикробной активности, оба производных показали одинаковый уровень токсичности на клетках роговицы глаза в концентрации 10мкМ [O'Toole *et al.*, 2012].

Brunel с соавторами сообщают об исследовании антибактериальной активности моно- (47), ди- (48) и трифосфониевых (49) ионных жидкостей, (Рисунок 9). Вещества продемонстрировали высокую антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий (МИК *S. aureus* =0,5мкг/мл) и несколько меньшую в отношении грамотрицательных бактерий (16 мкг/мл). Противоион и количество положительно заряженных групп фосфора не влияли на активность в отношении грамположительных бактерий. Эти соединения не

являются субстратами эффлюкс насоса, что говорит об их способности избежать развития устойчивости у бактерий. Однако, вещества оказались токсичными в отношении гепатоцитов человека (HepG2). Причем наиболее (более чем в 40 раз) токсичным оказался монокатионный аналог [Brunel *et al.*, 2018].

Другой пример сравнения моно – ди-, три- и тетракатионных фосфониевых солей (50-53) (Рисунок 10) провели Sommers с коллегами. Вещества отличались длиной алкильного радикала у атома фосфора, а у бисфосфониевых солей варьировалась еще и длина спейсера между катионными группами. Ожидается, что активность веществ сильно зависела от длины алкильного заместителя. Среди монокатионных аналогов (50) наибольшая активность в отношении *S. aureus* (в том числе MRSA) была у веществ с длиной липофильного радикала в 11-13 атомов углерода (МИК=0,5-1мкМ). В остальных случаях наиболее активными были соли с децильным радикалом (МИК=0,5-1 мкМ). Увеличение длины линкерной цепи незначительно повышало эффективность дикатионных производных (51). Наилучший результат среди всех протестированных соединений продемонстрировало бисфосфониевое производное с децильным радикалом и гексильной линкерной цепью, однако данное вещество было токсично на клетках крови человека. Увеличение числа фосфониевых групп не усиливало противомикробную активность, но снижало ее, как в случае с тетракатионными (53) производными (МИК в отношении *S. aureus* = 16 мкМ) [Sommers *et al.*, 2022].

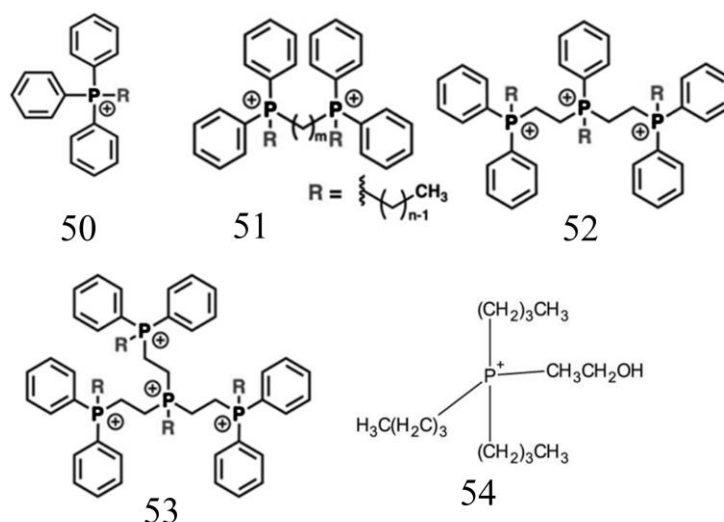


Рисунок 10 – Структурные формулы фосфониевых солей (50-54).

Часто фосфониевые соли включают в полимер для придания ему антимикробных свойств. Так были получены фотоотверждаемые покрытия с добавлением фторированной фосфониевой соли. Включение фосфониевой соли в полимер не оказывало существенного влияния на его физико-химические свойства, при этом придавало веществу антибактериальный эффект [Сакмаксі *et al.*, 2019]. Еще одним примером является малослойный графит, функционализированный тетрадецилтрифенил фосфония бромидом. Сам по себе графит не обладает антимикробными свойствами, однако при включении ТФФ⁺ фрагмента, антибактериальная активность возрастала с увеличением содержания ТФФ⁺ в смеси [Хіе *et al.*, 2011].

Но в некоторых случаях, полимеризация фосфониевых солей (или присоединение их к полимерному носителю) снижает антибактериальный эффект исходной соли. Как сообщается в работе Wylie с соавторами, противомикробные свойства докузата трибутил(2-гидроксиэтил)фосфония (54) (Рисунок 10) снижались при введении в поливинилхлорид [Wylie *et al.*, 2020].

Как и в предыдущих случаях, активность полимерных солей зависит от длины алкильного радикала у атома фосфора. Например, описаны антимикробные целлюлозные фильтры, содержащие биоциды фосфония на поверхности. Наибольший эффект был продемонстрирован для наиболее гидрофобных соединений [Kanazawa *et al.*, 1994].

1.3.4.4 Сравнение антимикробных свойств фосфониевых и аммониевых солей

Часто в литературе авторы сравнивают антимикробную активность фосфониевых и аммониевых солей. На сегодняшний день применение нашли некоторые четвертично аммониевые соли (ЧАС) в качестве антисептических и дезинфицирующих средств: бензалкония хлорид (55) (Рисунок 11), мирамистин (56) (Рисунок 11). Основной механизм антимикробного действия ЧАС – это разрушение цитоплазматической мембраны, которое приводит к утечке клеточного содержимого. Однако и к этим соединениям микроорганизмы вырабатывают устойчивость [Hegstad *et al.*, 2010].

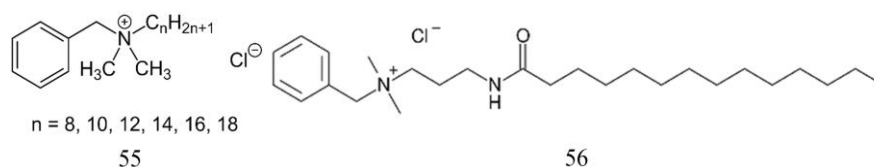


Рисунок 11 – Структурные формулы четвертичных аммониевых солей, используемых в качестве дезинфицирующих средств (55-56).

Из-за большего атомного радиуса фосфора по сравнению с азотом, фосфониевые соли обладают более сильным поляризационным эффектом, в результате чего более активно взаимодействуют с отрицательно заряженной мембраной микроорганизмов. Множество исследователей провели сравнения антибактериальной активности ЧФС и ЧАС. В 90-х и 2000-х годах свойства фосфониевых солей исследовали группа авторов Kanazawa, Ikeda, Endo [Kanazawa *et al.*, 2000]. Фосфониевые производные (57-58) оказались намного эффективнее аммониевых (59-60) аналогов (Рисунок 12): так воздействие фосфониевых производных в течение 30 минут приводило к гибели всех клеток *S. aureus* в образце, в то время как аммониевые производные не приводили к такому эффекту даже в течение 120 минут инкубации [Kanazawa *et al.*, 1994].

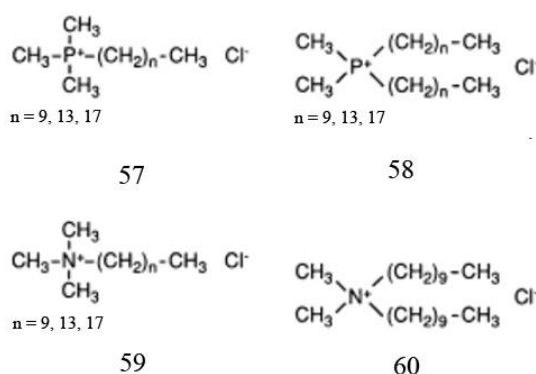


Рисунок 12 – Структурные формулы фосфониевых и аммониевых солей, описанные в работах Kanazawa с соавторами (57-60).

Сравнение бисфосфониевых (61) (Рисунок 13) и аммониевых солей (62) (Рисунок 13), производных пиридоксина, провели Никитина с соавторами [Nikitina *et al.*, 2016]. Оба производных проявили антимикробную активность. Однако

фосфониевые соли оказались немного более эффективны, особенно в отношении *E. coli*. Авторы также отмечают разные механизмы действия производных ЧАС и ЧФС: аммониевые соли были чувствительны к присутствию ионов кальция в среде, что говорит о том, что данные соединения интегрируются в мембрану. В то время как активность фосфониевого производного пиридоксина не изменялась в присутствии ионов кальция.

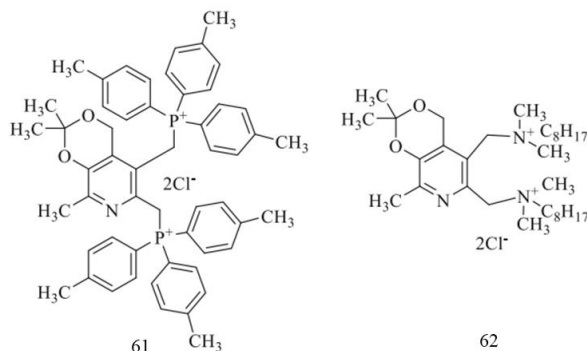


Рисунок 13 – Структурные формулы фосфониевых и аммониевых солей, описанные в работах Никитиной Е.В. с соавторами (61-62).

Более выраженные антимикробные свойства проявляют и полимерные ЧФС по сравнению с ЧАС. В обзоре Хуе с коллегами приводится несколько таких примеров [Хуе *et al.*, 2015]. El-Newehy и другие сообщают, что хитозан, модифицированный ЧФС был более эффективен в отношении тестируемых штаммов бактерий и грибов чем ЧАС [El-Newehy *et al.*, 2014]. Chang с соавторами получили полимерные ЧАС и ЧФС, содержащие полифениленоксид. В данной работе фосфониевые соли воздействовали как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии, в отличие от аммониевых производных, которые были эффективны только против грамотрицательных бактерий [Chang *et al.*, 2010].

Преимущество фосфониевых солей перед аммониевыми заключается не только в улучшенной антимикробной активности, но и в способности избегать резистентности у различных микроорганизмов. Так в работе Michaud с соавторами были рассмотрены аммониевые и фосфониевые соединения, эффективные в отношении бактерий *Acinetobacter baumannii*. При тестировании веществ на 35 устойчивых клинических изолятах *A. baumannii* было отмечено, что исследуемые

фосфониевые соединения были более активными по сравнению с ведущими коммерческими ЧАС. Тем не менее, была выявлена корреляция между резистентностью к антибиотику Колистину и ЧАС. Панрезистентный изолят устойчивый к колистину, проявлял резистентность и к протестированным ЧАС. Однако фосфониевое производное сохраняло эффективность против данного штамма. Кроме того, авторы пытались изучить развитие устойчивости у исследуемых соединений, однако при обработке фосфониевыми солями, не наблюдалось появления устойчивых мутантов. Вещества были также эффективны против биопленок [Michaud *et al.*, 2022].

Однако не всегда различия между аммониевыми и фосфониевыми производными значительно отличаются. Так в работе Sivapragasam с коллегами вещества проявили сходную активность, а основной вклад в токсичность вносил не катион, а анион [Sivapragasam *et al.*, 2019]. Явных различий не наблюдалось и в другой работе, где авторы сравнивали активность против биопленок у пиллар[5]аренов, содержащих фосфониевые фрагменты (63, 64, 67) и их аммониевых аналогов (65, 66, 68) (Рисунок 9) [Joseph *et al.*, 2016].

В некоторых же случаях фосфониевые соли уступают аммониевым. Так в работе Каюмова с соавторами было показано, что несмотря на то, что МИК в отношении планктонных клеток у исследованных соединений был примерно на одном уровне, фосфониевые соли значительно уступали ЧАС в отношении биопленок. Тем не менее, производные фосфониевых солей были менее токсичны в отношении клеточных линий человека [Каюмов *et al.*, 2015].

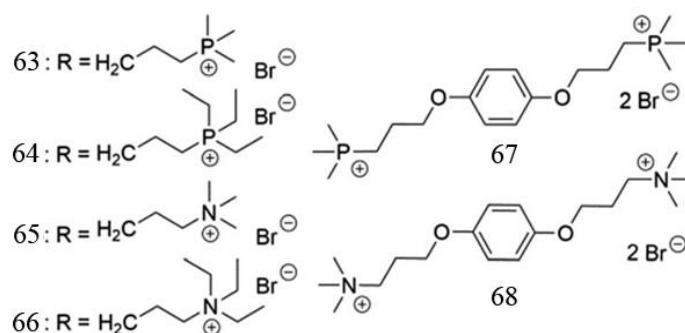


Рисунок 14 – Структурные формулы аналогов фосфониевых и аммониевых солей (63-68).

1.3.5 Фосфониевые соли, обладающие антимикробными и цитотоксическими свойствами

Учитывая вышесказанное, наблюдается сходство между цитотоксическим и антимикробным действием фосфониевых солей: схожая зависимость структура-активность, схожий механизм действия, основанный на проникновении веществ через мембраны, широкий спектр активности и отсутствие четкой молекулярной мишени. Не удивительно, что многие ученые рассматривают фосфониевые соли в качестве биоцидов двойного действия (противоопухолевого и антимикробного). Главным преимуществом этого подхода является возможность одновременно с химиотерапией опухоли проводить профилактику и лечение инфекционных заболеваний, которые часто возникают при лечении рака.

Например, фосфониевые соли, производные пиридоксина продемонстрировали антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий *S. aureus* (МИК соединения лидера (69) (Рисунок 15) = 4 мкг/мл) и клеток рака молочной железы MCF-7 (IC_{50} = 3,7 мкМ) [Shtyrlin *et al.*, 2016]. В другой работе были рассмотрены производные розмариновой кислоты, модифицированные фосфониевыми солями (70) (Рисунок 15). Сама по себе розмариновая кислота обладает как антимикробными, так и противоопухолевыми свойствами. Однако модификация фосфониевыми солями усилила ее активность в несколько раз [Fialová *et al.*, 2019]. Фосфониевые производные салициловой (СК) (71) и ацетилсалициловой кислот (АСК) (72) (Рисунок 15), описанные в работе Цепяевой с соавторами также активны в отношении нескольких опухолевых клеточных линий. IC_{50} наиболее активных соединений = 0,6–1,9 мкМ. Кроме того, вещества продемонстрировали высокую антимикробную активность. Самая низкая МИК для производных СК и АСК составила 4 и 1 мкМ соответственно [Tsepaeva *et al.*, 2021]. Возможна модификация фосфониевыми солями известных препаратов, способных обладать двойным действием. Например, 5-фторурацил, известный противоопухолевый препарат, обладающий антимикробным действием (МИК_{*S.aureus*} = 2 мкг/мл, МИК_{*E.coli*} = 16 мкг/мл) был модифицирован тригексилфосфониевым фрагментом (73) (Рисунок 15), в результате чего антимикробная активность

вещества немного улучшилась ($\text{МИК}_{S.aureus} = 1 \text{ мкг/мл}$, $\text{МИК}_{E.coli} = 8 \text{ мкг/мл}$). К сожалению, в данной работе не рассматривался противоопухолевый потенциал изучаемых производных [Patil *et al.*, 2023].

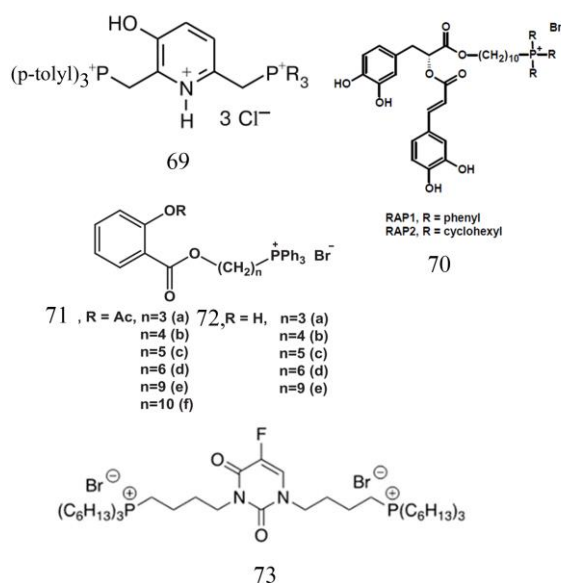


Рисунок 15 – Структурные формулы фосфониевых солей, обладающих двойной: антимикробной и противоопухолевой активностью (69-73).

1.3.6 Другие биологические свойства фосфониевых солей

Фосфониевые соли могут обладать активностью в отношении паразитических простейших. Так в серии работ Dardonville с соавторами описываются производные фосфониевых солей, эффективные против *Trypanosoma brucei*. Вещества останавливают клеточный цикл простейших на стадии G1, предотвращая переход к синтетической фазе. Авторы отмечают воздействие соединений на митохондрии: снижение митохондриального мембранного потенциала и уровня АТФ [Dardonville *et al.*, 2015; Alkhaldi *et al.*, 2016; Luque-Ortega *et al.*, 2010].

Сообщается также о фосфониевых солях, обладающих противовирусной активностью. Nissim с соавторами получили силан-фосфониевые тонкие покрытия, которые эффективны против вирусов и биопленок [Nissim *et al.*, 2023]. Трифенилфосфониевые производные хитозана, описанные Moura Junior с коллегами были эффективны против короновируса MNV-3 [de Moura Junior *et al.*,

2023]. Хие с соавторами также удалось получить полимерные фосфониевые соли с противовирусным эффектом. Авторы предполагают, что эффективность исследуемых фосфониевых производных в отношении вируса гриппа связана с воздействием их на оболочку вируса, которая представляет собой липидную мембрану, и разрушением сайта связывания рецептора - оболочечного гликопротеина гемагглютинина (Рисунок 16 А-Б).

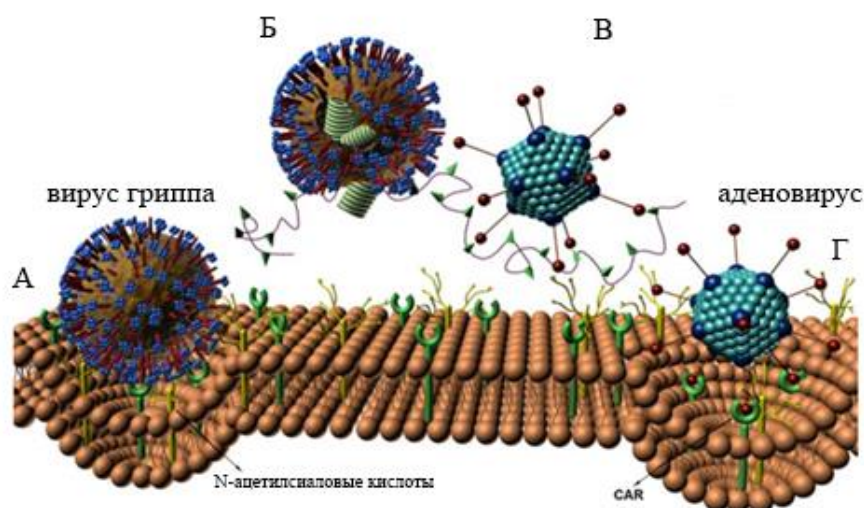


Рисунок 16 – Механизм противовирусного действия фосфониевых солей предложенный Хие с соавторами (А) Связывание вируса гриппа с рецептором N-ацетилсialовой кислоты и поглощение клеточной мембраной (Б) проникновение фосфониевых солей в вирусную оболочку с последующим разрушением липидов (В) ингибирование аденовируса фосфониевыми солями при входе в клетку посредством блокирования связи между рецептором CAR и волокнистым белком (Г) связывание аденовируса с рецептором CAR, опосредованное белком клетчатки, и образование клариновой ямки.

Однако более высокую активность вещества продемонстрировали в отношении аденовируса, вируса без оболочки, состоящего из икосаэдрического капсида, двухцепочечной ДНК и белков. В данном случае авторы предполагают, что механизм действия фосфониевых производных обусловлен инкапсулированием вируса, в результате чего блокируются его сайты связывания с клеткой (Рисунок 16 В-Г) [Хие *et al.*, 2014; Хие, Хiao, 2016].

Заключение к обзору литературы

Онкологические заболевания остаются серьезной угрозой для здоровья и жизни людей. Многие способы лечения рака, такие как радиотерапия, химиотерапия и хирургическое вмешательство, сопряжены с серьезными последствиями для пациентов. Одним из осложнений является иммуносупрессия, что делает пациента более уязвимым для инфекций. Большое количество возбудителей инфекций, устойчивых к антибиотикам, усугубляет эту проблему.

За счет липофильности и положительного заряда фосфониевые соли обладают широким спектром биологических свойств: цитотоксических, антимикробных, противовирусных и т.д. Эти соединения могут проникать через мембраны в ответ на $\Delta\Psi$. Например, митохондриальное нацеливание фосфониевых солей реализуется именно благодаря отрицательному мембранному потенциалу митохондрий. Так в медицине и косметологии нашли применение митохондриально-направленные антиоксиданты – ионы Скулачева, производные пластохинона, модифицированные трифенилфосфониевым фрагментом.

Ученые со всего мира сообщают о цитотоксических и антимикробных свойствах фосфониевых солей. Однако намного меньше внимания уделяется механизму действия этих соединений. Редко исследователи рассматривают фосфониевые соли как вещества двойного действия (т.е. обладающие антимикробными и противоопухолевыми свойствами) и проводят корреляцию между этими двумя свойствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клеточные линии, используемые в работе

В работе были использованы 12 опухолевых клеточных линий человека (Таблица 1). В качестве условно-нормальных моделей для оценки селективности действия использованы линии Chang Liver и RPMI-1788.

Печень – это орган, который в большой степени подвержен повреждениям, возникающим в результате воздействия токсических веществ. Поэтому клетки печени могут являться хорошей моделью для оценки цитотоксичности тестируемых соединений. Клеточная линия Chang liver произошла из нормальной ткани печени. Клетки этой линии способны синтезировать характерные для клеток печени белки, в том числе щелочную фосфатазу печеночного типа [Ludueñ *et al.*, 1977]. Впоследствии было обнаружено, что эти клетки обладают группой хромосом, изначально описанной для клеток HeLa [Lavappa *et al.*, 1976]. Но в дальнейшем было подтверждено, что клетки Chang liver обладают свойствами гепатоцитов: выявлена экспрессия функциональных белков печени, альбумина (ALB), цитохрома P450 3A4 (CYP3A4) и уридиндифосфатгликозилтрансферазы (UGT) [Chang, 1978]. А также клетки Chang liver не демонстрируют туморогенных свойств на иммунодефицитных мышах, в отличие от клеточной линии HepG2 (клетки карциномы печени человека) [Yang *et al.*, 2013].

Лимфобластоподобная линия RPMI-1788 получена из периферической крови здорового человека, поэтому ее можно рассматривать в качестве модели для оценки общей цитотоксичности *in vitro* [CLS Product Information: RPMI 1788]. Прямое сравнение адгезионных клеток и суспензионных является методологическим упрощением. Различия в метаболизме, типах роста и путях клеточной смерти могут влиять на чувствительность к соединениям. Однако использование данной суспензионной линии позволяет оценить избирательность действия соединений в отношении пролиферирующих клеток разного генеза.

Таблица 1 – Клеточные линии, используемые в работе.

Наименование	Тип культуры*	Происхождение линии	Источник	Среда, используемая для культивирования
Chang liver	A	Гепатоцитоподобные клетки.	НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (Россия)	Стандартная среда Игла-МЕМ
RPMI 1788	C	лейкоциты периферической крови здорового донора	Институт Цитологии РАН (Россия)	RPMI-1640
M-HeLa клон 11	A	эпителиоидная карцинома шейки матки. сублиния HeLa. клон M-HeLa 11	Институт Цитологии РАН (Россия)	Стандартная среда Игла-МЕМ
MCF-7	A	аденокарцинома молочной железы	Институт Цитологии РАН (Россия)	Стандартная среда Игла-МЕМ
HuTu 80	A	аденокарцинома двенадцатиперстной кишки	Институт Цитологии РАН (Россия)	Стандартная среда Игла-МЕМ
PANC-1	A	карцинома поджелудочной железы	Институт Цитологии РАН (Россия)	Стандартная среда Игла-МЕМ
A 549	A	карцинома легкого	Институт Цитологии РАН (Россия)	Стандартная среда Игла-МЕМ
T 98G	A	глиобластома	Институт Цитологии РАН (Россия)	Стандартная среда Игла-МЕМ
Hep G2	A	карцинома печени	Институт Цитологии РАН (Россия)	Стандартная среда Игла-МЕМ
HL-60	C	периферическая кровь. промиелоцитарная лейкемия	Институт Цитологии РАН (Россия)	RPMI-1640
PC-3	A	Аденокарцинома предстательной железы	Типовая коллекция клеточных культур (ATCC. USA)	Стандартная среда Игла-МЕМ
SK-OV-3	A	аденокарцинома яичника	Клеточный репозиторий CSL (Германия).	DMEM F12
A-375	A	злокачественная меланома	Клеточный репозиторий CSL (Германия).	DMEM
DU-145	A	карцинома предстательной железы	Клеточный репозиторий CSL (Германия).	Стандартная среда Игла-МЕМ

* - указание типа клеточной культуры, где А – адгезивная линия, С – суспензионная линия

Таким образом, применение вышеуказанных клеточных линий обусловлено доступностью и воспроизводимостью для первичного скрининга, что позволило оценить общую цитотоксичность соединений *in vitro*. Ограничения моделей учтены при интерпретации результатов.

Описание и приготовление питательных сред, перечисленных в таблице, указано ниже. Все клеточные линии выращивали при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для открепления клеток от субстрата использовали раствор, содержащий смесь Трипсина (0,25%) (ПанЭко, Россия) и Версена (0,02%) (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:3 по объему.

Стандартная среда Игла-Мем (ПанЭко, Россия) используется с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% раствора незаменимых аминокислот (ПанЭко, Россия). Среда RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) используется с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки. Среда ДМЕМ F12 (ПанЭко, Россия) – с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 2мМ L-глутамина. Среда ДМЕМ с глутамином (ПанЭко, Россия) используется с добавлением 1% незаменимых аминокислот и 10% фетальной бычьей сыворотки.

2.2 Штаммы тест-микроорганизмов, используемые в работе

В работе были использованы следующие штаммы микроорганизмов. Грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P FDA 209P, *Bacillus cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922 и грибы *Candida albicans* ATCC 10231, которые были получены из государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск». Резистентные штаммы *Staphylococcus aureus* MRSA-1 и MRSA-2 были предоставлены бактериологической лабораторией Республиканской Клинической Больницы Республики Татарстан (РКБ РТ).

Для культивирования микроорганизмов были использованы стандартные питательные среды Мюллера-Хинтона (Condalab, Испания) для культивирования бактерий и Сабуро (БТН, Россия) для выращивания грибов. Инкубацию бактерий проводили при 37°C, грибов – при 25°C.

2.3 Химические соединения и реагенты, используемые в работе

В работе были исследованы два гомологичных ряда новых производных фосфониевых солей: Дифенилалкил-2-гидроксифенилэтинилфосфоний хлориды (первый ряд соединений) и Алкил-2-гидроксibenзилфосфоний хлориды (второй ряд соединений) (Рисунок 17). Данный класс соединений характеризуется наличием ковалентно связанного фармакофорного фенольного фрагмента, а также заменой одного из фенильных колец ТФФ⁺ на алкильные цепи, что позволяет легко управлять липофильностью производных. Вещества были синтезированы в лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений ИОФХ им. А.Е. Арбузова – Обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН.

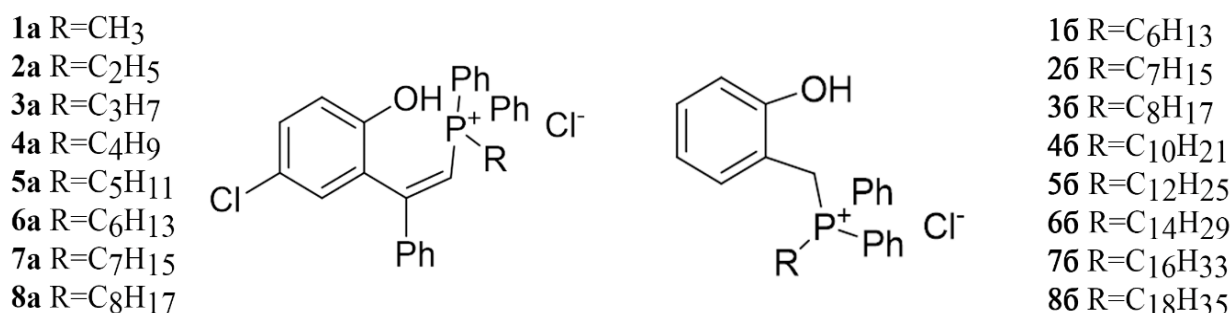


Рисунок 17 – Структурные формулы исследуемых фосфониевых солей.

Дифенилалкил-2-гидроксифенилэтинилфосфоний хлориды (первый ряд соединений) (1a-8a); Алкил-2-гидроксibenзилфосфоний хлориды (второй ряд соединений) 16-86.

В качестве препаратов сравнения были использованы субстанции антибиотиков: Норфлоксацин (Sigma, США), Кетоконазол (Fisher Bioreagents, США), Амоксициллин (Sigma, США), Грамицидин С (Sigma, США), Доксорубин (Sigma, США).

2.5 Изучение цитотоксических свойств фосфониевых солей

2.5.1 Определение гемолитической активности

Гемолитическую активность соединений оценивали путем сравнения оптической плотности раствора исследуемого соединения с оптической плотностью раствора крови крысы при 100% гемолизе. Забор крови проводили из

кончика хвоста крыс аутбредной линии Wistar (самцы, возраст 3-4 месяца, масса тела – 300-350 г) в соответствии с протоколом этического комитета ФИЦ КазНЦ РАН № 24/1 от 4 октября 2024 г. В работе изучали гемолитическую активность исследуемых соединений в диапазоне значений МИК в отношении тест-штаммов микроорганизмов, растворы которых готовили в физиологическом растворе (0,9% NaCl) (с добавлением 5% ДМСО). Измерение оптической плотности супернатанта проводили на микропланшетном ридере Invitrologic (Россия) при $\lambda=540$ нм [Voloshina *et al.*, 2021]. Эксперимент проводили в трех повторах.

Расчет IC_{50} , (концентрация вещества, при которой происходит разрушение 50% эритроцитов) производился с помощью онлайн-калькулятора: MLA - «Калькулятор Quest Graph™ IC50» [AAT Bioquest, Inc].

2.5.2 Оценка цитотоксичности на клеточных линиях человека с помощью МТТ -теста

Цитотоксичность соединений в отношении культур клеток оценивали с помощью МТТ теста. В данном методе используется желтый тетразолевый краситель 3-(4,5- Диметилтиазол-2- ил)-2,5- дифенилтетразолия бромид (реагент МТТ), который в живых клетках под действием НАД(Ф)Н-зависимых оксидоредуктазных ферментов восстанавливается до формазана [MTT Assay Protocol].

Адгезивные культуры клеток засеивали в количестве 10^5 клеток/мл в 96-луночные одноразовые планшеты с плоским дном. Суспензионные клеточные культуры в количестве 10^5 клеток/мл выращивали в V-образных планшетах. Клетки инкубировали в CO_2 инкубаторе в течение 24 ч. Затем добавляли растворы исследуемых соединений и снова культивировали в течение суток. Затем отбирали питательную среду и окрашивали раствором МТТ (0,5 мг/мл) (Sigma, США). Через 4 ч инкубации, образовавшиеся нерастворимые фиолетовые кристаллы формазана растворяли в ДМСО. Оптическую плотность раствора измеряли с помощью микропланшетного ридера Invitrologic (Россия) при $\lambda=540$ нм. Эксперимент проводили в трех повторах три независимых раза.

Расчет IC_{50} , (концентрация полумаксимального ингибирования – это концентрация вещества, вызывающая гибель 50% клеток в популяции) производился с помощью онлайн-калькулятора: MLA - «Калькулятор Quest Graph™ IC_{50} » [AAT Bioquest, Inc]. В качестве препарата сравнения использовался Доксрубицин (Sigma-Aldrich, США).

2.5.3 Оценка индукции апоптоза в клетках после воздействия исследуемых соединений

Анализ проводили с использованием набора Annexin V-Alexa Fluor™ Apoptosis Detection Kit (Thermo, США) согласно стандартному протоколу, предоставленному производителем [Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit]. Для этого клетки М-HeLa снимали с культуральных флаконов и пересевали на 24 луночные планшеты, используя стандартные методики. В каждой лунке планшета содержалось 10^6 клеток. После 24 ч инкубации, к полученному монослою добавляли растворы исследуемых соединений. Затем, спустя сутки, клетки открепляли, суспензию осаждали при 2000 об/мин в течение 5 мин. После этого осадок дважды промывали холодным фосфатным буфером, снова осаждали при тех же условиях. Супернатант сливали и ресуспендировали осадок в 100 мкл биндинг буфера, являющегося компонентом набора «Annexin V- Alexa Fluor™ Apoptosis Detection Kit». Затем образцы инкубировали с красителями в количестве 0,35 мкл Annexin V-Alexa Fluor и 0,1 мкл PI (Sigma-Aldrich, США) в течении 40 мин при 37 °С в темноте. Детекцию результатов проводили на проточном цитометре (Guava easy Cyte, MERCK, США) по стандартным протоколам. Каждый образец анализировали в трех повторах.

2.5.4 Оценка изменения митохондриального мембранного потенциала

Оценку изменения митохондриального мембранного потенциала проводили с использованием Mitochondria Membrane Potential Kit (Sigma-Aldrich, США). В этом наборе используется катионный липофильный краситель JC-10, который накапливается в поляризованных митохондриях и образует J-агрегаты ($\lambda_{ex} = 540/\lambda_{em} = 590$ нм). При снижении митохондриального мембранного потенциала, митохондрии уже не могут удерживать краситель, и он переходит в форму J-

мономеров ($\lambda_{\text{ex}} = 490/\lambda_{\text{em}} = 525$ нм). Исследование проводили согласно стандартному протоколу, предоставленному производителем. Детекцию результатов проводили методом конфокальной микроскопии с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss Group, Германия) (совместно с междисциплинарным центром «Аналитическая микроскопия») и методом проточной цитометрии с использованием проточного цитометра Guava easy Cyte (Merck, США). Исследование проводили трижды.

2.5.5 Оценка уровня АФК в клетках

Измерение клеточного окислительного стресса проводили с использованием красителя CellROX® Deep Red (Invitrogen, США), который не флуоресцирует в восстановленном состоянии и проявляет яркую флуоресценцию в красной области спектра ($\lambda_{\text{ex}} = 644/\lambda_{\text{em}} = 665$ нм) при окислении активными формами кислорода. Эксперимент проводили согласно стандартному протоколу, предоставленному производителем [CellROX® Oxidative Stress Reagents].

Клетки инкубировали в среде с добавлением исследуемых соединений в течение 24 ч, затем открепляли и промывали дважды PBS. Клетки осаждали 5 минут при 2000 об/мин. К осадку добавляли питательную среду, содержащую 5 мкМ красителя, инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем отбирали среду и три раза промывали клетки PBS. Результаты получали методом проточной цитометрии (Guava easy Cyte, MERCK, США). Образцы анализировали в трех повторах.

2.5.6 Оценка изменений клеточного цикла

Изучение нарушений клеточного цикла проводили согласно опубликованной методике [Mamedov *et al.*, 2022]. Клетки инкубировали в среде с добавлением исследуемых соединений в течение 24 ч, затем открепляли от субстрата и осаждали 2000 об/мин в течение 5 мин, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) (ЭКОсервис, Россия) два раза. К осадку клеток добавляли 0,05 М фосфатно-цитратный буфер (рН = 4,0; 7,7 мл 0,2 М Na_2HPO_4 ; 12,29 мл 0,1 М лимонной кислоты), перемешивали, затем центрифугировали 2000 об/мин в течение 5 мин. К осадку добавляли 0,125 мкл 0,1% Тритон X-100, 2,5 мкл красителя PI (Sigma-Aldrich, США) и 147,5 мкл PBS и инкубировали 60 мин при температуре 37°С.

Детекцию результатов проводили трижды с использованием проточного цитометра Guava EasyCyte (Merck, США).

2.5.7 Исследование адгезивных свойств клеток М-HeLa в режиме реального времени

Оценка влияния исследуемых соединений на клетки М-HeLa в режиме реального времени была проведена при помощи xCELLigence S16 Real-time Analysis System RTCA (Acea Biosciences, США). Данный метод позволяет проводить непрерывный мониторинг адгезивных свойств клеток *in vitro* неинвазивным способом. В системе RTCA используются специальные планшеты, на дне которых расположены пластины, имеющие массив золотых электродов высокой плотности. Клетки, прикрепляясь ко дну планшета, влияют на электрический импеданс (комплексное электрическое сопротивление) массива. Программное обеспечение xCELLigence регистрирует эти изменения и преобразует их в значения клеточного индекса (CI). Когда в лунке клетки отсутствуют или не прикреплены к электродам, CI равен нулю. Таким образом, клеточный индекс – это безразмерный параметр, который отображает биологическое состояние клеточной популяции, включающее количество клеток, их жизнеспособность, морфологию и степень адгезии [Zhang, 2021].

В специальные 16-луночные планшеты (E-Plate) (Acea Biosciences, США) вносили питательную среду для измерения фона. Затем в лунки добавляли суспензию, содержащую 5×10^5 клеток М-HeLa и проводили измерения каждые 15 мин в течение 24 ч в условиях культивирования клеток. Затем в лунки добавляли одинаковый объем растворов исследуемых соединений в различных концентрациях. В контрольные лунки вносили такой же объем питательной среды. В течение первых 6 ч измерения проводили с интервалом 30 сек, в последующие часы - с интервалом 15 мин. Для анализа результатов использовали программное обеспечение RTCA Software 2.0. Эксперимент проводили в трех повторах.

2.5.8 Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза и генотоксичности

Анализ проводили с использованием MILLIPLEX® 7-plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit и MILLIPLEX® MAP 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit (Merck, США) согласно стандартным протоколам, предоставленным производителем. Панель MILLIPLEX® 7-plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit позволяет определить такие маркеры как Akt (pS473), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), p53 (Ser46), JNK (Thr183/Tyr185), активные каспаза-8 (Asp384) и каспаза-9 (Asp315). Набор MILLIPLEX® MAP 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit позволяет определить фосфорилированные Chk1 (Ser345), Chk2 (Thr68), H2A.X (Ser139), p53 (Ser15) а также общий уровень ATR, MDM2 and p21.

Для подготовки образцов клетки инкубировали в присутствии исследуемых соединений в течение 24 ч, затем лизировали с использованием лизирующего буфера MILLIPLEX MAP (Merck, США), содержащего смесь ингибиторов протеаз P8340 (Sigma, США). Полученные лизаты клеток M-HeLa стандартизировали согласно общему уровню белка. Общий уровень белка измеряли с использованием реагента Бредфорда (Bio-Rad, США). Образцы анализировали в трех повторах. Значения интенсивности флуоресценции измеряли с помощью системы Luminex® MAGPIX® (Merck, США).

2.6 Изучение антимикробных свойств фосфониевых солей

2.6.1 Определение минимальной ингибирующей и бактерицидной (фунгицидной) концентрации.

Для оценки антимикробной активности фосфониевых солей определяли минимальную ингибирующую (МИК) и бактерицидную/ фунгицидную (МБК/ МФК) концентрации методом серийных двукратных микроразведений в жидких питательных средах [CLSI M207, 2018]. Для этого делали смыв с ночной культуры тест-штамма стерильным физиологическим раствором (0,9% NaCl). Разведения исследуемых соединений готовили непосредственно в питательной среде с добавлением 5% диметилсульфоксида (ДМСО) для лучшей растворимости.

Бактериальную суспензию, содержащую 10^7 КОЕ/мл, вносили в лунки 96-луночного планшета, содержащие питательную среду с добавлением исследуемых соединений в различных концентрациях. Микробная нагрузка в эксперименте составляла 3×10^5 КОЕ/мл для бактерий и 2×10^3 КОЕ/мл – для грибов. Образцы инкубировали при 37°C (бактерии), при 25°C (грибы) в течение 5 сут, ежедневно проводя мониторинг результатов. Минимальную концентрацию, при которой не обнаруживалось видимого роста, принимали за МИК. МБК/ МФК определяли путем пересева на агаризованную питательную среду инокулята из лунки, в которой не обнаруживалось видимого роста [CLSI, 1999]. МБК/ МФК определяли, как концентрацию, которая приводит к полной гибели микроорганизмов. Эксперимент проводили в трех независимых повторах.

2.6.2 Исследование лекарственной резистентности

Исследование развития лекарственной резистентности проводили по методике Lin с соавторами [Lin *et al.*, 2017]. В качестве препаратов сравнения использовали известные антибактериальные препараты различных классов: Норфлоксацин, Амоксициллин, Кларитромицин. Определяли МИК для исследуемого соединения и препаратов сравнения как было указано выше. Результаты МИК снимали через 24 ч инкубации. Бактериальная взвесь *S. aureus* ATCC209p, полученная в присутствии $0,5 \times \text{МИК}$ для каждого вещества использовалась для дальнейшего определения соответствующей МИК. Подобные измерения проводили в течении 17 пассажей. Эксперимент проводили в трехкратной повторности.

2.6.3 Исследования антимикробной активности фосфониевых солей по времени гибели

Исследования антимикробной активности фосфониевых солей по времени гибели проводили согласно методике Sianglum с соавторами [Sianglum *et al.*, 2011] с некоторыми изменениями. Суспензию ночной культуры *S. aureus*, содержащую 5×10^5 КОЕ/мл, вносили в пробирки с жидкой средой Мюллера-Хинтона, содержащей исследуемые соединения в концентрациях МИК, $2 \times \text{МИК}$, $4 \times \text{МИК}$ и $10 \times \text{МИК}$. В качестве контроля использовали образец без добавления фосфониевых

солей. Для определения количества жизнеспособных клеток, из пробирок высевали 100 мкл суспензии в чашки с агаризованной средой Мюллера-Хинтона. Высев производили спустя 0, 30 мин, 1, 2, 4, 6 ч инкубации в трехкратной повторности. Посевы инкубировали при 37°C в течение 72 ч и затем проводили подсчет колоний. Результаты представляли в форме графика зависимости \log_{10} КОЕ/мл от времени.

2.6.4 Влияние фосфониевых солей на биопленки *S. aureus*

Анализ предотвращения образования и разрушения биопленки оценивали с помощью красителя кристаллического фиолетового (CV) [Kim *et al.*, 2020] и желтого тетразолиевого красителя 3-(4,5- Диметилтиазол-2- ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (реагент МТТ) [Katsipis *et al.*, 2023]. Краситель кристаллический фиолетовый – это основной краситель, который связывается с отрицательно-заряженными молекулами как на поверхности бактерий, так и во внеклеточном матриксе биопленки [Alonso *et al.*, 2017]. Окрашивание красителем МТТ позволяет оценить метаболически-активные клетки, т.к. в результате восстановления желтой соли тетразолия образуются нерастворимые кристаллы формазана. Анализ проводили в одноразовых 96-луночных планшетах.

Для оценки ингибирования образования биопленки, бактерии *S. aureus* в количестве 10^5 КОЕ/мл инкубировали в присутствии исследуемых соединений в бульоне Мюллера-Хинтона с добавлением 0,2% глюкозы при 37°C в течение 24 ч. В качестве контроля использовали микроорганизмы, которые не подвергались воздействию исследуемых соединений. Затем клеточную суспензию отбирали и лунки планшета промывали дважды стерильной дистиллированной водой для удаления планктонных клеток. Планшеты высушивали при 37°C. Затем каждую лунку окрашивали 100 мкл 0,1% раствора CV или раствором МТТ в концентрации 1 мг/мл. Через 30 мин лунки дважды промывали дистиллированной водой и добавляли 100 мкл растворителя (96% этилового спирта для растворения красителя кристаллического фиолетового и ДМСО для растворения кристаллов формазана). Оптическую плотность измеряли на микропланшетном ридере Invitrologic (Россия) при 540 нм.

Для определения степени разрушения образовавшейся биопленки под воздействием фосфониевых солей, суспензию микроорганизмов в количестве 10^5 КОЕ/мл засеивали в 96-луночные планшеты и инкубировали 24 ч при 37°C . Затем отбирали питательную среду вместе с планктонными клетками и добавляли растворы исследуемых соединений в стерильной питательной среде. Затем снова инкубировали 24 ч при 37°C . После инкубации, лунки планшета промывали, окрашивали и детектировали как было описано выше. Влияние фосфониевых солей на биопленки исследовали трижды в трех независимых повторах.

Уровень ингибирования (разрушения) биопленки определяли по формуле (2):
 Ингибирование (разрушение) биопленки, % = $\left(1 - \frac{\text{ОП}_{\text{опыт}}}{\text{ОП}_{\text{контроль}}}\right) * 100\%$, (2)

где $\text{ОП}_{\text{опыт}}$ – оптическая плотность в лунке после воздействия исследуемых фосфониевых солей, $\text{ОП}_{\text{контроль}}$ – оптическая плотность в контрольной лунке.

2.6.5 Оценка влияния фосфониевых солей на целостность цитоплазматической мембраны бактерий

Воздействие исследуемых фосфониевых солей на проницаемость цитоплазматической мембраны изучали методом окрашивания бактерий флуоресцентным красителем йодидом пропидия (PI). Этот интеркалирующий краситель способен проникать через повреждённую мембрану и связываться с молекулой ДНК.

Ночную культуру *S. aureus* подращивали до середины логарифмической фазы в бульоне Мюллера-Хинтона. Дважды промывали в физиологическом растворе и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Клетки ресуспендировали в физиологическом растворе до 2×10^8 КОЕ/мл. Полученную суспензию добавляли к растворам исследуемых соединений в соотношении 1:1, инкубировали 30 мин при 37°C . Затем к образцам добавляли краситель PI до конечной концентрации 1,5 мкМ, инкубировали в темноте при 37°C в течение 60 мин. Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Швейцария) при длине волны возбуждения 544 нм и длине волны

испускания 620 нм [Tyagi *et al.*, 2015]. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Визуализацию результатов проводили с использованием набора LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit. В данном случае бактериальную суспензию окрашивали двумя красителями: SYTO™ 9 и PI согласно протоколу, предоставленному производителем. Изображения получали при помощи флуоресцентного микроскопа Nikon eclipse Ci-S (Nikon, Japan).

2.6.6 Оценка изменения мембранного потенциала бактерий *S. aureus*

Анализ деполяризации цитоплазматической мембраны бактерий проводили с использованием флуоресцентного красителя DiSC3(5) (3',3'-дипропилтиадикарбоцианин) по методике Winkel с коллегами с некоторыми изменениями [Winkel *et al.*, 2016]. Цианиновый краситель DiSC3(5) в растворе проявляет максимальную интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения/ испускания 622/670 нм, но проникая в поляризованные клетки, демонстрирует сдвиг максимума эмиссии до 688 нм и значительное снижение интенсивности флуоресценции. При деполяризации мембраны интенсивность флуоресценции растет за счёт выхода красителя из клеток [Smith *et al.*, 1981].

Ночную культуру *S. aureus* подращивали до середины логарифмической фазы, дважды промывали в физиологическом растворе и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Суспензию микроорганизмов доводили до 10⁸ КОЕ/мл и инкубировали в присутствии исследуемых соединений в течение 30 мин при 37 °С. затем добавляли краситель DiSC3(5) (BLDpharm, Китай) до конечной концентрации 1 мкМ, инкубировали 5 мин в темноте. Детекцию результатов проводили с помощью флуоресцентного спектрофотометра Hitachi F-7100 (Япония) при длине волны возбуждения 622 нм и длине волны испускания 640-750 нм. Исследование проводили в трех повторностях.

2.6.7 Анализ морфологических изменений *S. aureus* методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)

Анализ морфологических изменений бактериальных клеток методом ПЭМ проводили совместно с Междисциплинарным центром «Аналитическая

микроскопия» (КФУ, Казань). Суспензию бактерий инкубировали в присутствии исследуемых соединений при 37°C в течение часа. Подготовку образцов проводили по ранее опубликованной методике [Terekhova *et al.*, 2022]. Микроскопическое исследование образцов осуществлялось в HR-ТЕМ режиме на просвечивающем электронном микроскопе Hitachi HT 7700 Excellence при ускоряющем напряжении 100 кэВ с разрешением 0,144 нм. По набору эталонных ПЭМ-изображений из литературных данных отмечены характерные морфологические изменения [Li *et al.*, 2017; Hartmann *et al.*, 2010; Aruldass *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017; Nishino *et al.*, 1975; Kawai *et al.*, 2009]. Затем проводили морфометрический анализ бактериальных клеток по полученным микрографиям. Подсчитывали общее число клеток, сохранивших свою целостность, количество делящихся клеток и количество клеток, только начавшие свое деление, а также проводился подсчет диаметра клеток. Все подсчеты проводили на площади равной 775 кв. мкм.

2.6.8 Анализ протеомного профиля *S. aureus*

Исследование проводили совместно с междисциплинарным центром протеомных исследований ИФМиБ КФУ (Казань) и лабораторией физико-химического анализа ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН (Казань). Анализ протеомного профиля *S. aureus* осуществляли методом двумерного электрофореза белков с дифференциальным окрашиванием. Для проведения протеомных испытаний, суточную культуру *Staphylococcus aureus* вносили в количестве 100 мкл, содержащих 10⁸ КОЕ/мл в растворы исследуемых соединений в питательной среде в концентрациях, соответствующих МИК и 10×МИК. Образцы инкубировали 1 ч при 37°C. Подготовку образцов проводили по ранее опубликованной методике [Terekhova *et al.*, 2022].

Идентификацию белков проводили с помощью масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker) и поисковой машины MASCOT, используя базу данных Staphyl_aur_sub_aur. В параметрах поиска указывали 1 возможный пропущенный сайт трипсинолиза, ошибка MS – 0,3 Да, вероятная модификация – окисление метионина.

2.7 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016 и Past4.17. Расчет IC_{50} , HC_{50} производился с помощью онлайн-калькулятора: MLA - «Калькулятор Quest Graph™ IC_{50} ». Нормальность распределения оценивали с применением критерия Колмогорова – Смирнова и Шапиро-Уилка. Для анализа данных с нормальным распределением использовали дисперсионный анализ ANOVA с применением критерия Даннета. Достоверность различий для данных с ненормальным распределением оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения. Различия считали значимыми при значении $p \leq 0,05$. Табличные и графические данные содержат средние значения и стандартное отклонение.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение цитотоксических свойств фосфониевых солей

3.1.1 Определение гемолитической активности исследуемых фосфониевых солей

Внутривенная инъекция является одним из возможных путей введения препарата, в таком случае клетки крови первыми столкнутся с потенциально-токсичными веществами. Разрушение мембраны эритроцитов легко детектируется, благодаря содержанию в этих клетках гемоглобина. Таким образом, оценка гемолиза является простым скрининг-тестом, позволяющим составить начальное представление о токсичности вещества и в дальнейшем перейти к исследованиям на более сложных моделях [Tramer *et al.*, 2012].

Данные гемолитической активности представлены в таблице 2 в значениях HC_{50} (концентрация, при которой наблюдается разрушение 50% эритроцитов). Исследования проводили в диапазоне концентраций 1 – 500 мкМ. Протестированные вещества продемонстрировали низкую гемолитическую активность по сравнению с препаратом сравнения Грамицидином С. Фосфониевые соли с меньшей длиной алкильного радикала (1-4а, 1-3б) не приводили к сильному разрушению эритроцитов в диапазоне исследуемых концентраций ($HC_{50} > 500$ мкМ). Значения HC_{50} в ряду соединений 5а – 8а уменьшались с увеличением их липофильности от 138 до 59 мкМ. Соединения 2-го ряда не продемонстрировали такую же четкую зависимость гемотоксичности от длины алкильного радикала. Значения HC_{50} соединений 4б-7б варьировали от 23 до 54 мкМ. Однако соединение 8б продемонстрировало $HC_{50} = 211$ мкМ, что может свидетельствовать о том, что увеличение длины алкильного радикала до октадецильного является критичным для данного вида активности.

3.1.2 Цитотоксичность исследуемых фосфониевых солей на клеточных линиях человека

Был проведен скрининг шестнадцати производных фосфониевых солей на 14 клеточных линиях человека. Полученные значения полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC_{50}), представленные в Таблице 3 и 4,

демонстрируют выраженную зависимость биологической активности от структурных особенностей исследуемых соединений. Наиболее значимым фактором, определяющим цитотоксичность соединений как в отношении адгезивных, так и суспензионных клеточных линий, является длина алкильного заместителя, непосредственно влияющая на липофильность молекул.

Таблица 2 – Гемолитическая активность фосфониевых солей.

№ соединения	IC ₅₀ , мкМ	№ соединения	IC ₅₀ , мкМ
1a	>500	16	>500
2a	>500	26	>500
3a	>500	36	>500
4a	>500	46	50,54±6,9
5a	137,8±10,5	56	22,56±3,5
6a	70,5±8,1	66	54,38±6,4
7a	68,3±8,1	76	33,4±5,9
8a	58,65±5,1	86	211,4±11,6
Грамицидин С	9,4±0,8		

В первом ряду исследованных соединений (1a-8a), для которого характерна более объемная структура катиона, наблюдается отчетливый скачок активности при удлинении алкильного радикала с бутильного (соединение 4a) до пентильного (соединение 5a), что свидетельствует о достижении необходимого баланса липофильности. Так, для линии M-HeLa значение IC₅₀ снижается с 40,0 мкМ до 6,5 мкМ, то есть более чем в 6 раз. Соединения с длиной алкильного заместителя от пентильного до октильного (5a–8a) проявили себя как наиболее активные в данном ряду, демонстрируя широкий спектр цитотоксического действия с IC₅₀ в диапазоне 3,8-9,3 мкМ для большинства опухолевых линий (M-HeLa, PC-3, A-375, Du-145, MCF-7, SK-OV-3).

В ряду алкил-2-гидроксibenзилфосфоний хлоридов, отличающихся более простым строением катиона, оптимальный диапазон смещен в сторону большей гидрофобности и наблюдается для веществ, содержащих при атоме фосфора от децильного до тетрадецильного радикала (соединения 4б–6б). Соединение 5б (додецильное производное) оказалось наиболее активным не только в своем ряду, но и среди всех синтезированных соединений, показывая значения IC_{50} , сопоставимые с таковыми для доксорубина, на ряде линий: 2,6 мкМ (M-HeLa), 4,9 мкМ (A-375), 3,5 мкМ (Du-145), 2,0 мкМ (SK-OV-3). Стоит отметить резкое снижение активности при переходе к октадецильному заместителю у атома фосфора, его цитотоксичность падает до уровня неактивных или слабоактивных соединений (IC_{50} от 24,6 до 93,5 мкМ). Вероятно, увеличение липофильности приводит к ухудшению фармакокинетических свойств молекулы, возможно, из-за агрегации в водной среде или нарушения оптимального механизма взаимодействия с биологическими мишенями.

Анализ чувствительности различных клеточных линий выявил, что наиболее восприимчивыми к действию исследованных фосфониевых солей являются линии карциномы шейки матки M-HeLa, карциномы простаты Du-145 и PC-3, меланомы A-375 и рака молочной железы MCF-7. Соединения второго ряда также демонстрируют высокую активность в отношении клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60 (IC_{50} соединений 3б-5б варьируют от 4,1 до 6,4 мкМ). Напротив, линия немелкоклеточного рака легкого A-549 проявила наивысшую устойчивость, особенно к соединениям первого ряда ($IC_{50} > 100$ мкМ для соединений 1а-3а, 17,6–43,5 мкМ для 4а-8а).

Таблица 3 – Цитотоксичность исследованных фосфониевых солей в отношении адгезионных клеточных линий человека.

IC ₅₀ , мкМ												
	M-HeLa	PC-3	A-375	Du-145	Hep G2	MCF-7	SK-OV-3	PANC-1	HuTu 80	A 549	T 98G	Chang liver
1a	70 ± 6,3	17,4±1,7	16,1±1,5	24,6±1,9	20,7±1,5	30,6±3,2	16,7±1,9	22,4 ± 2,1	24,9±2,1	>100	20,7±2,1	28,5± 2,1
2a	80 ± 6,9	21,3±2,0	23,7±2,2	23,3±2,1	13,1±2,1	28,2±2,7	53,5±12,1	19,7 ± 1,9	23,9±2,1	>100	28,1±2,3	28,1± 1,9
3a	40 ± 3,5	15,5±1,5	47,5±5,5	33±2,8	11,7±1,6	24,9±2,5	10,3±2,5	25,0± 2,1	22,3±2,0	>100	20,2±1,8	14,1± 1,3
4a	40 ± 3,9	8,2±0,8	12,8±1,1	23±2,2	12,8±0,3	15,3±1,6	6,0±1,1	19,4 ± 1,5	6,3±0,5	43,5±4,1	11,7±1,0	21,9 ± 2,0
5a	6,5 ± 0,6	17,7±2,2	6,8±0,7	14±1,9	9,3±3,6	6,3±0,5	5,2±1,3	19,3± 1,6	6,7±0,6	42,0±4,1	19,2±1,7	14,1 ± 1,3
6a	6,1 ± 0,6	15,5±1,6	9,2±0,8	11,8±1,5	11±2,5	5,6±0,7	5,4±0,8	19,3 ± 1,9	6,5±0,6	34,2±3,0	28,6±2,5	14,8 ± 1,4
7a	4,6 ± 0,4	17,3±1,9	7,7±0,8	10,6±2,1	13,1±5,5	4,9±0,5	5,4±0,9	16,6 ± 1,5	4,5±0,3	17,6±1,5	21,2±1,9	20,2 ± 1,7
8a	6,4 ± 0,5	7,8±0,8	6,7±1,7	12,3±1,1	3,9±3,3	3,8±0,5	5,8±0,5	15,7 ± 1,3	10,8±0,9	36,8±3,5	26,5±2,3	31,8 ± 3,0
1б	50,0 ± 3,9	11,6±1,1	40,4±4,5	49,2±5,9	83±6,9	86,0±7,3	35,3±9,1	82,0 ± 6,7	55,2±5,1	98,5±9,7	>100	65,3 ± 5,1
2б	5,5 ± 0,4	15,4±1,4	11,7±2,2	27,1±3,2	26,3±2,3	32,8±2,7	16,5±2,3	40,0 ± 3,2	32,0±3,0	35,3±3,1	>100	41,6 ± 3,5
3б	3,7 ± 0,3	6,9±0,7	15,1±1,3	17,1±2,5	25,7±2,1	12,5±0,9	9,3±1,2	12,5 ± 1,1	13,2±1,1	25,5±2,2	25,0±2,1	46,3 ± 3,8
4б	3,4 ± 0,2	4,5±0,5	5,9±0,6	3,9±0,4	12,3±1,2	13,2±1,1	2,6±0,5	26,3 ± 2,3	11,1±1,0	51,9±5,0	22,3±2,0	45,7 ± 3,6
5б	2,6 ± 0,1	10,4±1,2	4,9±0,5	3,5±0,5	9,8±0,7	7,2±0,6	2±0,1	25,3 ± 2,1	4,8±0,5	28,1±2,8	7,7±0,7	42,8 ± 3,3
6б	3,5 ± 0,3	11±1,3	10,5±1,2	11,8±2,1	6,6±0,5	6,6±0,5	5,4±0,9	25 ± 2,1	6,2±0,6	49,4±4,8	27,2±2,4	42,3 ± 3,4
7б	3,2 ± 0,2	4,1±0,4	14,8±1,3	15,8±1,4	12,6±1,1	13,2±1,2	4,9±0,6	25,7 ± 2,2	6,5±0,6	62,6±6,2	>100	45,2 ± 3,8
8б	68 ± 5,2	28,6±5,5	24,6±2,5	27,3±3,9	73±6,1	18,2±1,4	22,6±1,9	65,0 ± 4,8	53,1±4,9	93,5±9,0	59,7±5,5	69,0 ± 5,5
Доке*	3,0±0,3	1,5±0,6	1,3±0,1	0,9±0,1	3,3±0,2	3,1±1,6	0,5±0,1	3,2±0,2	3,0±0,2	3,0±0,2	5,7±0,5	3,0±0,3

* — Доксорубин

Таблица 4 – Цитотоксичность исследованных фосфониевых солей в отношении суспензионных клеточных линий человека.

№ соединения	IC ₅₀ , мкМ		№ соединения	IC ₅₀ , мкМ	
	HL-60	RPMI 1788		HL-60	RPMI 1788
1a	26,8±3,6	27,73±5,1	1б	35,5±5,5	32,0±2,6
2a	57,8±6,9	15,8±1,3	2б	7,7±1,2	10,8±2,2
3a	27,5±2,1	31,4±2,5	3б	4,1±0,3	15,6±6,5
4a	21,4±1,5	22,2±1,2	4б	5,9±1,6	19,6±3,6
5a	20,7±3,3	7,7±0,5	5б	6,43±1,13	23,9±5,6
6a	16,8±6,5	12,6±2,1	6б	15,6±3,6	39,0±5,9
7a	13,8±0,9	12,1±0,9	7б	6,8±1,1	17,6±2,5
8a	14,9±1,3	25,1±10,6	8б	12,4±0,9	35,4±4,6
Докс*	1,7±1,89	3,25±0,37			

* — Доксорубицин

3.1.3 Оценка селективности соединений в отношении раковых клеточных линий человека

Для оценки избирательности действия веществ был рассчитан индекс селективности (ИС) - отношение токсичной концентрации образца к его эффективной биоактивной концентрации. Вещество считается высокоселективным при $ИС \geq 10$ [Indrayanto *et al.*, 2021], однако в некоторых источниках высокоселективным считают и соединения, чей $ИС \geq 3$ [Weerapreeyakul *et al.*, 2012].

Селективность цитотоксического действия соединений на раковые клетки оценивалась как отношение IC₅₀ в отношении условно нормальных клеточных линий к IC₅₀ в отношении опухолевых линий. В качестве условно-нормальных линий были использованы гепатоцитоподобные клетки Chang liver (Таблица 5) и лейкоциты периферической крови RPMI 1788 (Таблица 6).

Вещества второго ряда также показали себя как более селективные. В отношении клеток M-HeLa ИС соединений 3б-7б ≥ 10 при сравнении с IC₅₀ клеток Chang liver и ИС соединения 6б ≥ 10 при сравнении с IC₅₀ клеток RPMI

1788. Селективность соединений первого ряда не превышает 10. Так у соединения-лидера 8a ИС на клетках M-HeLa, Hep G2, MCF-7 и SK-OV-3 равен 5,0, 8,1, 8,4 и 5,5 соответственно.

Таблица 5 – Индекс селективности цитотоксического действия исследуемых соединений на раковые клеточные линии, рассчитанный относительно IC_{50} для клеток Chang liver.

	M-HeLa	PC-3	A-375	Du-145	HepG2	MCF-7	SK-OV-3	PANC-1	HuTu80	A 549	T 98G	HL-60
1a	0,4	1,6	1,8	1,2	1,4	0,9	1,7	1,3	1,1	-	1,4	1,1
2a	0,4	1,3	1,2	1,2	2,1	1,0	0,5	1,4	1,2	-	1	0,5
3a	0,4	0,9	0,3	0,4	1,2	0,6	1,4	0,6	0,6	-	0,7	0,5
4a	0,6	2,7	1,7	1,0	1,7	1,4	3,7	1,1	3,5	0,5	1,9	1,0
5a	2,2	0,8	2,1	1,0	1,5	2,2	2,7	0,7	2,1	0,3	0,7	0,7
6a	2,4	1,0	1,6	1,3	1,3	2,6	2,7	0,8	2,3	0,4	0,5	0,9
7a	4,4	1,2	2,6	1,9	1,5	4,1	3,7	1,2	4,5	1,1	0,9	1,5
8a	5,0	4,1	4,6	2,6	8,1	8,4	5,5	2,0	2,9	0,9	1,2	2,1
1б	1,3	5,6	1,6	1,3	0,8	0,8	1,8	0,8	1,2	0,7	-	1,8
2б	7,6	2,7	3,6	1,5	1,6	1,3	2,5	1,0	1,3	1,2	-	5,4
3б	12,5	6,8	3,1	2,7	1,8	3,7	5,0	3,7	3,5	1,8	1,9	11,3
4б	13,4	10,2	7,6	11,5	3,7	3,5	17,9	1,7	4,1	0,9	2,1	7,7
5б	16,4	4,1	8,8	12,3	4,4	5,9	21,4	1,7	8,9	1,5	5,6	6,7
6б	12,1	3,9	4,0	3,6	6,4	6,4	7,8	1,7	6,8	0,9	1,6	2,7
7б	14,1	11,2	3,1	2,9	3,6	3,4	9,2	1,8	7	0,7	-	6,7
8б	1,0	2,4	2,8	2,5	0,9	3,8	3,1	1,1	1,3	1,4	1,2	5,6
Докс*	1,0	2,1	2,3	3,4	0,9	1,0	6,0	0,9	1	1	0,5	1,8

(—) определение ИС невозможно из-за низкой цитотоксичности соединения

* — Доксорубин

Однако при интерпретации данных о селективности действия исследуемых соединений необходимо учитывать ограничения, связанные с выбором клеточных моделей. Таким образом, высокий индекс селективности соединений указывает не на абсолютную безопасность для здоровых клеток

человек, а на перспективную избирательность в отношении некоторых опухолевых моделей *in vitro*.

Таблица 6 – Индекс селективности цитотоксического действия исследуемых соединений на раковые клеточные линии, рассчитанный относительно IC_{50} для клеток RPMI-1788.

	M-HeLa	PC-3	A-375	Du-145	HepG 2	MCF-7	SK-OV-3	PANC-1	HuTu 80	A 549	T 98G	HL-60
1a	0,4	1,6	1,7	1,1	1,3	0,9	1,7	1,2	1,1	-	1,3	1,0
2a	0,2	0,7	0,7	0,7	1,2	0,6	0,3	0,8	0,7	-	0,6	0,3
3a	0,8	2,0	0,7	1,0	2,7	1,3	3,0	1,3	1,4	-	1,6	1,1
4a	0,6	2,7	1,7	1,0	1,7	1,5	3,7	1,1	3,5	0,5	1,9	1,0
5a	1,2	0,4	1,1	0,5	0,8	1,2	1,5	0,4	1,1	0,2	0,4	0,4
6a	2,1	0,8	1,4	1,1	1,1	2,2	2,3	0,7	1,9	0,4	0,4	0,7
7a	2,6	0,7	1,6	1,1	0,9	2,5	2,2	0,7	2,7	0,7	0,6	0,9
8a	3,9	3,3	3,6	2,0	6,4	6,6	4,3	1,6	2,3	0,7	0,9	1,7
1б	0,6	2,8	0,8	0,6	0,4	0,4	0,9	0,4	0,6	0,3	-	0,9
2б	2,0	0,7	0,9	0,4	0,4	0,3	0,7	0,3	0,3	0,3	-	1,4
3б	4,2	2,3	1,0	0,9	0,6	1,2	1,7	1,2	1,2	0,6	0,6	3,8
4б	5,8	4,4	3,3	4,9	1,6	1,5	7,7	0,7	1,8	0,4	0,9	3,3
5б	9,2	2,3	4,9	6,9	2,4	3,3	12,0	0,9	5,0	0,9	3,1	3,7
6б	11,1	3,6	3,7	3,3	5,9	5,9	7,2	1,6	6,3	0,8	1,4	2,5
7б	5,5	4,4	1,2	1,1	1,4	1,3	3,6	0,7	2,7	0,3		2,6
8б	0,5	1,2	1,4	1,3	0,5	1,9	1,6	0,5	0,7	0,4	0,6	2,9
Докс*	1,1	2,1	2,5	3,7	1,0	1,0	6,5	1,0	1,1	1,1	0,6	1,9

(—) определение ИС невозможно из-за низкой цитотоксичности соединения

* — Доксорубин

3.1.4 Индукция апоптоза в клетках M-HeLa в результате воздействия исследуемых соединений

На примере соединений лидеров было показано, что вещества способны индуцировать дозозависимый апоптоз в клетках M-HeLa в концентрациях, близких к IC_{50} (Рисунок 18). Так при воздействии 8a в концентрации 5 мкМ и 10 мкМ доля клеток в популяции в стадии раннего апоптоза составила 38,9% и 47,1% соответственно. При высокой концентрации также наблюдается

значительное увеличение числа клеток в состоянии позднего апоптоза (19,0%). После обработки клеток М-HeLa соединением 5б с увеличением концентрации также растет доля клеток в состоянии раннего апоптоза (36,34% для 3 мкМ, 52,66% для 6 мкМ). В то время как количество клеток на стадии позднего апоптоза значительно не меняется (24,08% для 3 мкМ, 27,24% для 6 мкМ).

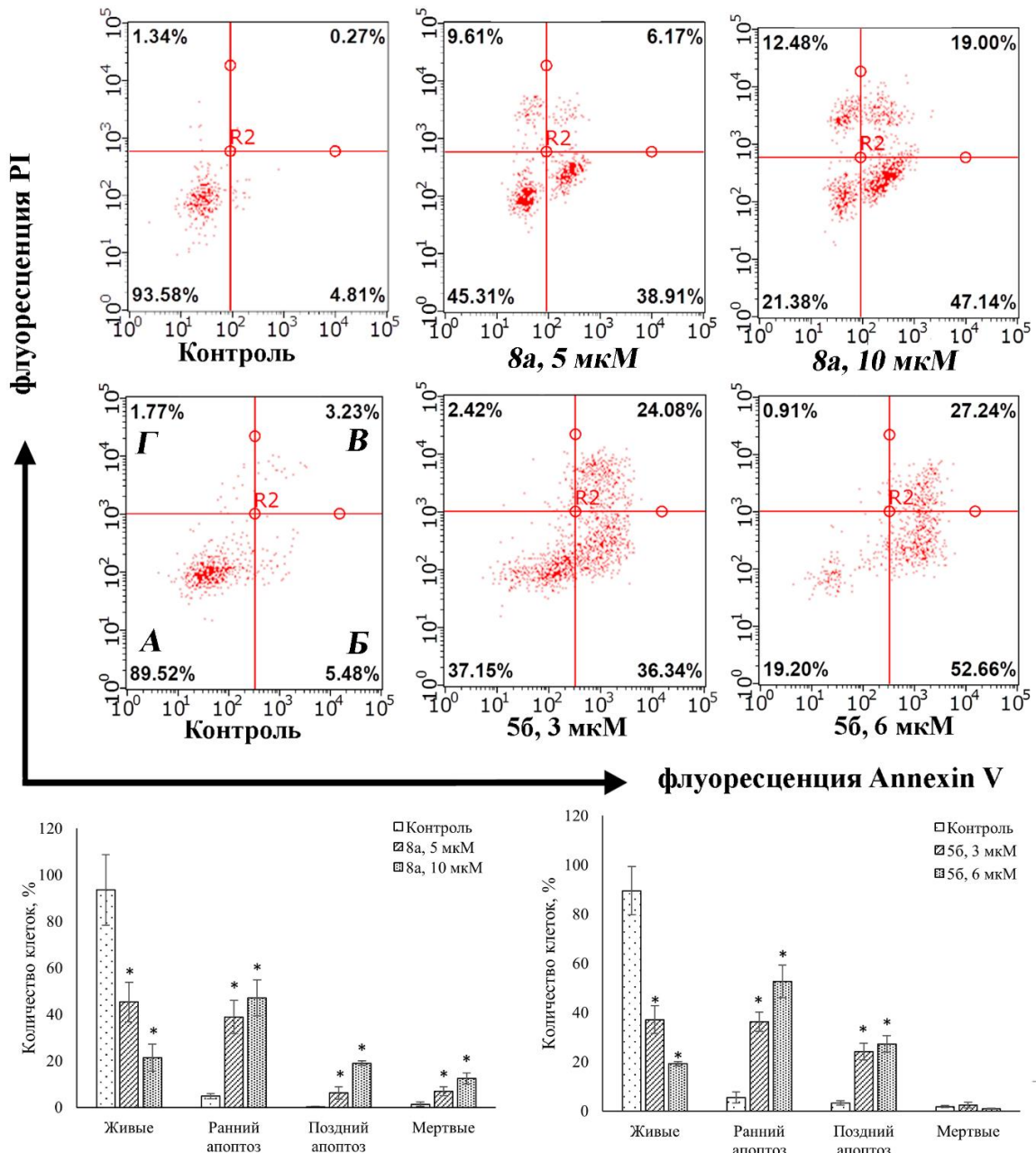


Рисунок 18 – Индукция апоптоза в клетках М-HeLa в результате 24 ч воздействия исследуемых фософниевых солей; А – живые клетки, Б- клетки на стадии раннего апоптоза, В – клетки на стадии позднего апоптоза, Г – мертвые клетки. $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

3.1.5 Оценка изменения митохондриального мембранного потенциала

Было показано, что обработка клеток М-HeLa исследуемыми веществами вызывает дозозависимое снижение митохондриального мембранного потенциала. Причем эффект более выражен для соединения 8a (при 10 мкМ доля клеток с пониженным митохондриальным мембранным потенциалом возрастает до 73,3%). Для соединения 5b было выявлено увеличение числа клеток с J-мономерами до 23.17% (при концентрации 3 мкМ) и 60.38% (при концентрации 6 мкМ). Фотографии, полученные с помощью конфокального микроскопа, также подтверждают данные результаты (Рисунок 19).

3.1.6 Оценка уровня АФК в клетках

На рисунке 20 представлены результаты изменения уровня АФК в клетках М-HeLa в присутствии исследуемых фосфониевых солей. Вещества приводят к увеличению уровня АФК, причем наиболее сильный эффект продемонстрировало соединение 5b, которое приводил к усиленному накоплению АФК в клетках, интенсивность флуоресценции красителя CellROX® Deep Red равна 5600, что превышает контрольный уровень (интенсивность флуоресценции = 312) более чем в 10 раз.

3.1.7 Оценка изменений клеточного цикла

Результаты исследования изменения клеточного цикла при воздействии фосфониевых солей представлены на Рисунке 21. Было продемонстрировано, что клеточный цикл в опытных клетках частично останавливается в фазе G1. Так при воздействии 8a в концентрации 5 мкМ доля клеток в этой фазе возрастает на 20% относительно контроля, а при воздействии 5b в концентрации 3 мкМ на 27% относительно контроля. При этом также значительно снижается доля клеток в фазе митоза (M): на 32% при воздействии 8a и более чем в два раза (на 68%) при воздействии 5b.

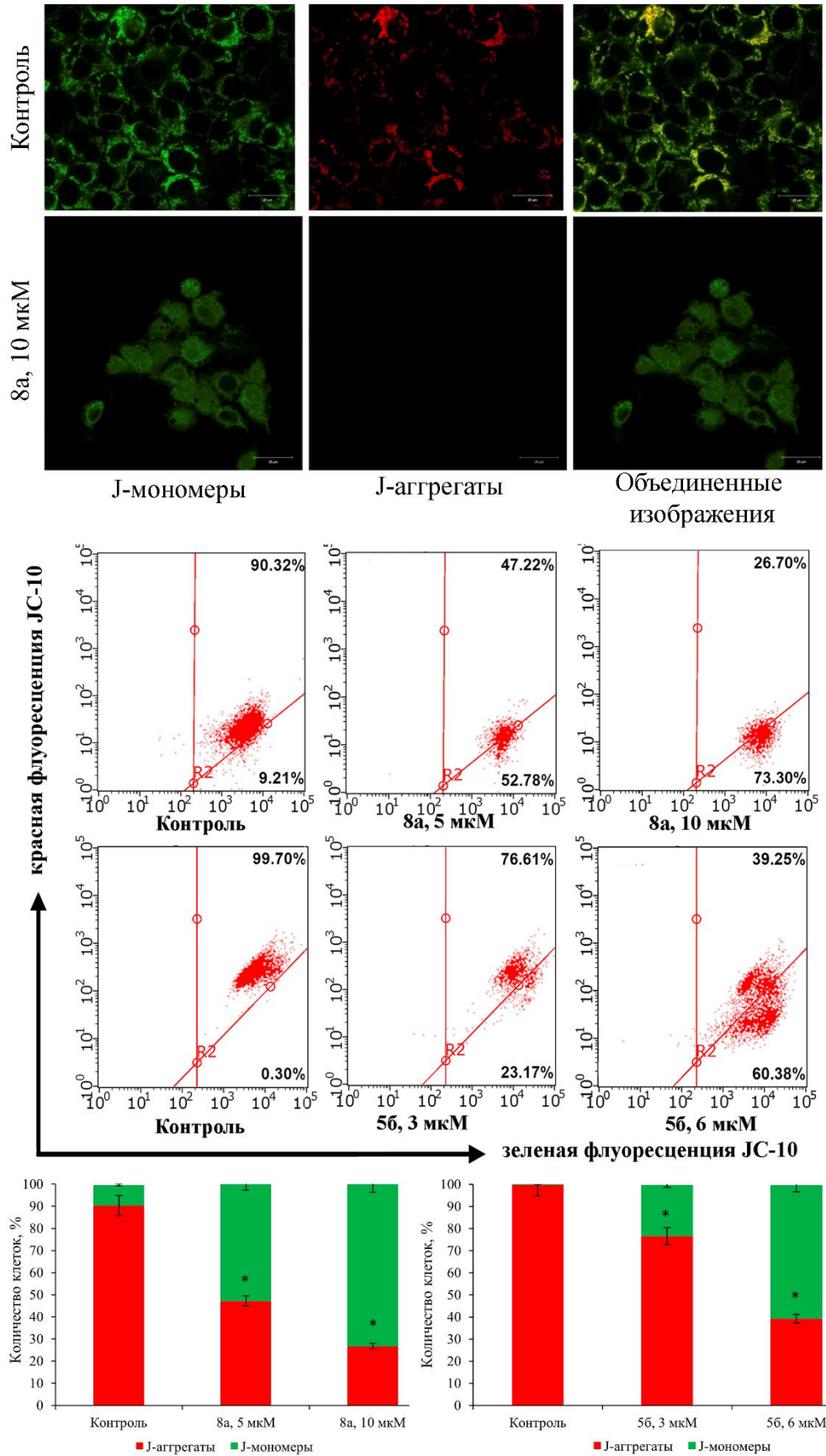


Рисунок 19 – Изменение митохондриального мембранного потенциала клеток M-NeLa в результате 24 ч воздействия исследуемых фосфониевых солей. $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

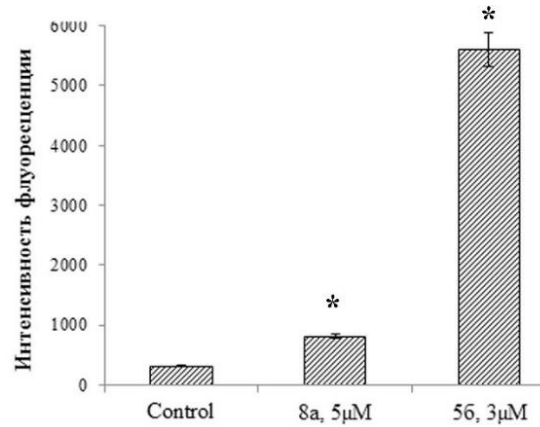


Рисунок 20 – Уровень АФК в клетках М-HeLa в результате 24 ч воздействия исследуемых фосфониевых солей. $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

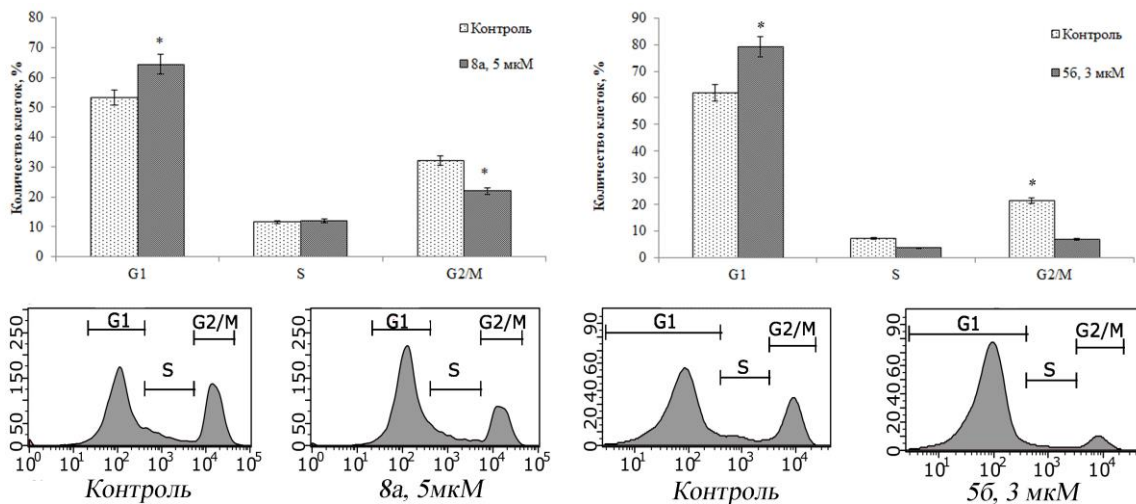


Рисунок 21 - Влияние исследуемых фосфониевых солей на клеточный цикл клеток М-HeLa в результате 24 ч инкубации с веществами. $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

3.1.8 Исследование адгезивных свойств клеток М-HeLa в режиме реального времени

Оценка влияния исследуемых соединений на клетки М-HeLa в режиме реального времени была проведена при помощи XCELLigence S16 Real-time Analysis System RTCA. На рисунке 22 представлен график изменения клеточного индекса (CI) от времени.

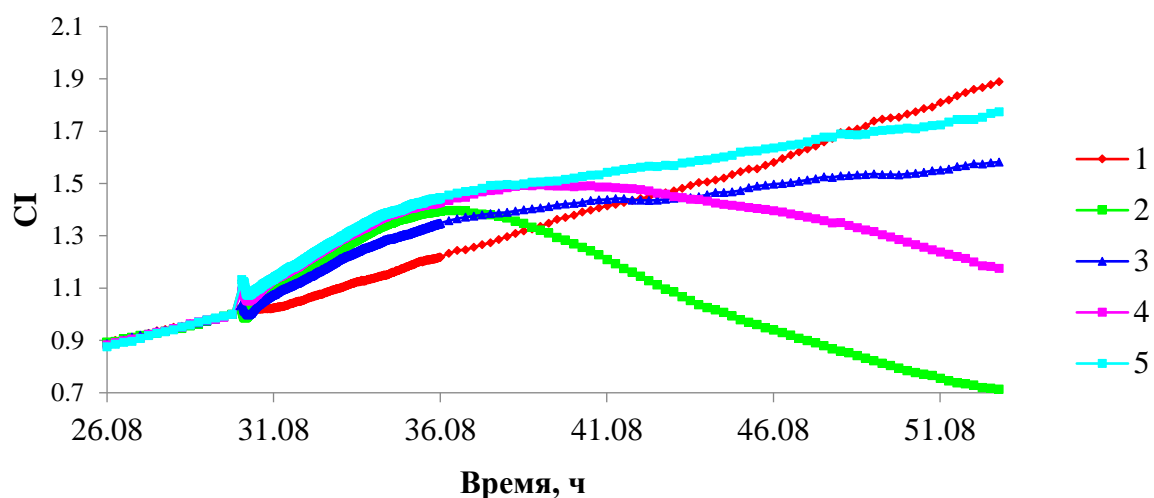


Рисунок 22 – Изменение адгезивных свойств клеток M-HeLa при воздействии исследуемых соединений. 1- интактные клетки, 2 – 8a 10 мкМ, 3 – 8a 5 мкМ, 4 – 5б 6 мкМ, 5 – 5б 3 мкМ.

Полученные данные демонстрируют четкую дозозависимую динамику ответа клеток. При воздействии концентраций, близких к значению IC_{50} , регистрируется значительное снижение скорости роста клеточного индекса по сравнению с контрольной культурой, что свидетельствует об эффективном ингибировании пролиферации. Увеличение концентрации соединений в 2 раза (до $2 \times IC_{50}$) приводит к выраженному цитотоксическому эффекту, который проявляется уже в первые 5–10 часов инкубации. Так, при обработке клеток соединением 8a в концентрации 10 мкМ отмечается резкое падение CI, а в течение 24 часов наблюдается практически полная гибель клеток в лунке.

Интересной особенностью кинетических кривых, наблюдаемой для ряда соединений в первые часы после внесения, является кратковременное увеличение клеточного индекса, превышающее контрольный уровень. Данный феномен может быть интерпретирован как следствие компенсаторной клеточной реакции, которая может включать изменение морфологии клеток (распластывание) или попытку ускорения деления в ответ на стресс. В дальнейшем этот эффект сменяется фазой угнетения пролиферации и цитотоксичности.

3.1.9 Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза

Результаты мультиплексного анализа маркеров раннего апоптоза представлены на рисунке 23, где интенсивность флуоресценции маркеров в контрольном образце принята за 100%. По данным эксперимента выявлено значительное увеличение интенсивности флуоресценции каспазы-9 в экспериментальных образцах по сравнению с контролем. В то время как каспаза-8 остается на уровне контроля.

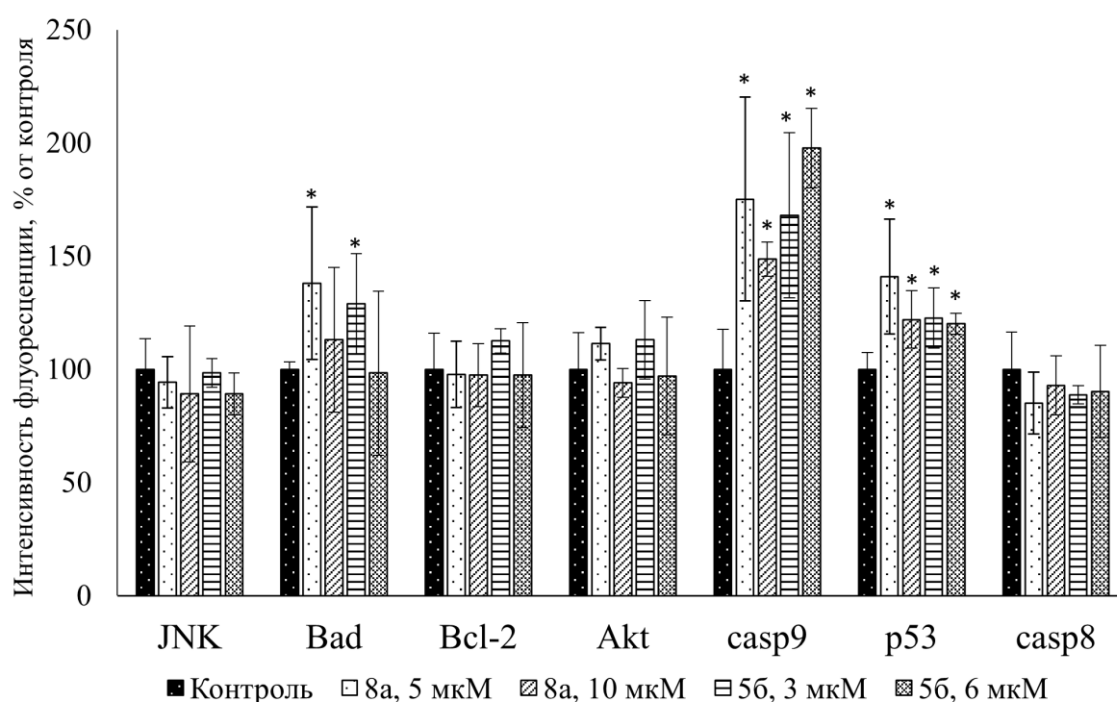


Рисунок 23 – Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза в клетках M-HeLa после 24 ч воздействия исследуемых фосфониевых солей.

$p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

Также в образцах, обработанных веществами в концентрациях, близких к IC_{50} , обнаружено небольшое увеличение белка Bad и p53. Маркеры Akt, Bcl-2 и JNK оставались на уровне контроля.

3.1.10 Мультиплексный анализ маркеров повреждения ДНК/генотоксичности

Результаты мультиплексного анализа маркеров повреждения ДНК/генотоксичности представлены на рисунке 24, интенсивность флуоресценции

маркеров в контрольном образце принята за 100%. Было выявлено значительное увеличение белков MDM2 и p21, наблюдается небольшое увеличение p53. Усиление флуоресценции ATR и фосфорилированного H2A.X наблюдалось лишь в концентрациях, в два раза превышающих IC₅₀. Достоверного увеличения киназ контрольных точек CHK1 и CHK2 не было отмечено.

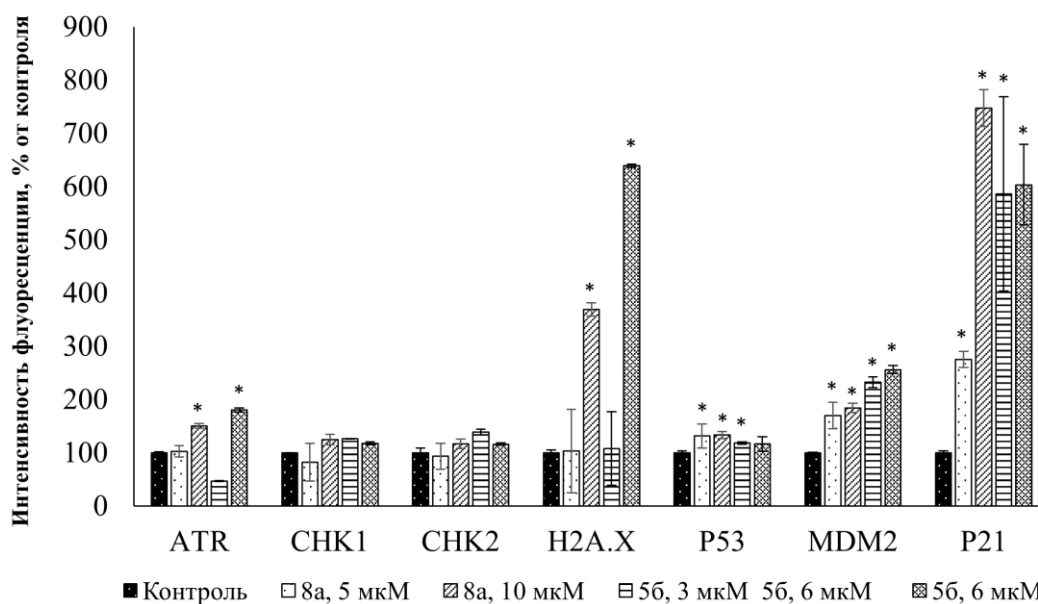


Рисунок 24 – Мультиплексный анализ маркеров повреждения ДНК/генотоксичности в клетках M-HeLa после 24 ч воздействия исследуемых фосфониевых солей. $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

3.2 Изучение антимикробных свойств новых производных фосфониевых солей

3.2.1 Определение Минимальной ингибирующей и бактерицидной/фунгицидной концентрации

На первом этапе работы был проведен первичный скрининг новых производных фосфониевых солей на наличие антимикробной активности. Результаты представлены в таблицах 8, 9 и 10 в значениях МИК и МБК (МФК).

Таблица 8 – Бактериостатическая активность исследуемых соединений.

№ соединения	МИК мкМ				
	Бактерии				Грибы
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1a	67,3±12,9	67,3±12,9	67,3±12,9	-	268,8±51,7
2a	16,3±3,1	32,6±6,3	32,6±6,3	-	130,5±25,1
3a	15,8±3,1	15,8±3,1	31,6±6,1	-	63,5±12,2
4a	30,8±5,9	15,4±2,9	15,4±2,9	493,1±94,9	246,5±47,5
5a	7,5±1,4	7,5±1,4	15,0±2,9	479,8±92,3	29,9±5,8
6a	3,6±0,7	7,3±1,4	7,3±1,4	233,6±45,0	29,2±5,6
7a	7,1±1,3	7,1±1,3	0,9±0,2	-	227,7±21,4
8a	6,9±1,3	6,9±1,3	0,9±0,2	-	111,0±11,0
1б	18,9±3,6	37,8±7,3	151,5±29,2	-	606,1±116,6
2б	18,3±3,5	36,6±7,0	73,4±14,1	-	586,2±112,8
3б	8,8±1,7	17,7±3,4	35,4±6,8	-	283,8±54,6
4б	1,0±0,2	1,9±0,3	8,3±1,6	-	16,6±3,2
5б	1,0±0,2	1,0±0,2	1,0±0,2	-	7,9±1,5
6б	3,6±0,7	3,6±0,7	3,6±0,7	-	14,9±2,9
7б	3,4±0,6	14,1±2,7	56,7±10,9	-	14,1±2,7
8б	108,1±20,8	107,7±20,7	53,9±10,4	-	215,3±41,5
Норфлоксацин	7,5±1,4	24,4±4,7	12,2±2,4	4,7±0,9	
Кетоконазол					7,3±1,4

(—) МИК >1000 мкМ

Вещества исследовали в диапазоне концентраций от 0,5 до 1000 мкМ. Соединения продемонстрировали избирательное антимикробное действие в отношении грамположительных бактерий. В ряду дифенилалкил-2-гидроксибензилэтилфосфоний хлоридов (соединения 1а-8а) антимикробная активность усиливается с увеличением длины алкильного радикала при атоме фосфора и достигает наилучших показателей у веществ с пентильным (5а), гексильным (6а), гептильным (7а) и октильным (8а) заместителями. Так в отношении штамма *Staphylococcus aureus* 209P для данных соединений МИК

= 3,6-7,5 мкМ. Кроме того, вещества были также эффективны против грибов *Candida albicans*. МИК соединений-лидеров определялись в диапазоне от 29 мкМ до 111 мкМ. Исследуемые фосфониевые соли практически не обладают антибактериальной активностью против грамотрицательных бактерий. МИК соединения ба в отношении бактерий *E. coli* составил 233,6 мкМ.

Таблица 9 – Бактерицидная/ Фунгицидная активность исследуемых соединений.

№ соединения	МБК(МФК) мкМ				
	Бактерии				Грибы
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1a	67,3±12,9	67,3±12,9	134,4±26,9	-	268,8±51,7
2a	32,6±6,3	32,6±6,3	65,3±12,6	-	261,0±50,2
3a	31,6±6,1	31,6±6,1	31,6±6,1	-	126,8±24,4
4a	31,6±6,1	30,8±5,9	30,8±5,9	-	246,5±47,5
5a	7,5±1,4	7,5±1,4	15,0±2,9	-	120,0±23,1
6a	3,6±0,7	7,3±1,4	14,6±2,8	-	29,2±5,6
7a	28,4±5,5	14,2±2,7	0,9±0,2	-	227,7±43,8
8a	13,9±2,7	13,9±2,6	0,9±0,3	-	111,0±21,4
1б	37,8±7,3	151,5±29,2	151,5±28,2	-	606,1±116,6
2б	18,3±3,5	146,5±28,2	73,4±14,1	-	586,2±112,8
3б	8,8±1,7	17,7±3,4	71,1±13,7	-	283,8±54,6
4б	4,1±0,8	4,1±0,8	8,3±1,6	-	16,6±3,2
5б	1,8±0,3	3,8±0,8	2,0±0,4	-	7,9±1,5
6б	14,9±2,9	476,6±91,7	14,9±2,9	-	14,9±2,9
7б	28,2±5,4	452,5±87,06	113,1±21,8	-	14,1±2,7
8б	215,3±41,5	215,3±41,5	53,9±10,4	-	215,3±41,5
Норфлоксацин	7,5±1,4	24,4±4,7	98,0±18,9	4,7±0,9	
Кетоконазол					7,3±1,4

(—) МБК>1000 мкМ

Вещества также обладают бактерицидными и фунгицидными свойствами в том числе в отношении споробразующих бактерий *B. cereus* и грибов *C. albicans*, т.е. концентрации МИК и МБК/МФК отличаются между собой не более чем в 4 раза. Соединения первого ряда были также эффективны против MRSA (Таблица 10). При этом некоторые вещества продемонстрировали более высокую антибактериальную активность в отношении устойчивых штаммов по сравнению со стандартным тест-штаммом *S. aureus* (МИК и МБК вещества 8a в отношении MRSA-1 и MRSA-2 = 1,6 и 3,4 мкМ соответственно).

Таблица 10 – Антимикробная активность исследуемых фосфониевых солей в отношении метициллин-резистентных штаммов *S. aureus*.

№ соединения	MRSA-1		MRSA-2	
	МИК, мкМ	МБК, мкМ	МИК, мкМ	МБК, мкМ
1a	33,5±6,4	33,5±6,4	16,8±3,2	33,5±6,4
2a	16,3±3,1	32,6±6,3	16,3±3,1	16,3±3,1
3a	15,8±3,0	15,8±3,0	15,8±3,0	15,8±3,0
4a	7,7±1,5	30,8±5,9	15,4±2,9	15,4±2,9
5a	7,5±1,4	7,5±1,4	7,5±1,4	15,0±2,9
6a	7,3±1,4	7,3±1,4	7,3±1,4	7,3±1,4
7a	7,1±1,4	7,1±1,4	3,5±0,7	3,5±0,7
8a	1,6±0,3	3,4±0,7	1,6±0,3	3,4±0,6
1б	75,6±14,5	302,4±58,2	37,8±7,3	151,5±29,2
2б	36,6±7,0	146,5±28,2	73,4±14,1	73,4±14,2
3б	35,4±6,8	141,9±27,3	17,7±3,4	35,4±6,8
4б	8,3±1,6	32,8±6,3	8,3±1,6	32,8±6,3
5б	1,8±0,3	7,9±1,5	3,8±0,7	15,7±3,02
6б	7,3±1,4	29,7±5,7	7,4±1,4	29,7±5,7
7б	28,2±5,4	-	14,1±2,7	113,1±21,8
8б	-	-	-	-
Ципрофлоксацин	377,3±72,6	377,3±72,6	3,0±0,6	3,0±0,6
Амоксициллин	85,7±16,5	85,7±16,5	85,7±16,5	85,7±16,5

(—) МИК, МБК > 500 мкМ

Алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды (2 ряд) проявили более высокую антимикробную активность по сравнению с соединениями первого ряда. Наилучшие результаты были получены для веществ с децильным (4б) и додецильным (5б) алкильными радикалами при атоме фосфора (МИК данных соединений в отношении бактерий *S. aureus* составил 1,0 мкМ). Стоит отметить, что при увеличении алкильного радикала до октадецильного, антимикробная активность вещества сильно снижается (МИК соединения 8б в отношении *S. aureus* составила 108,1 мкМ). Второй ряд соединений также обладает бактерицидными свойствами. Однако в отношении спорообразующей бактерии *Bacillus cereus* соединения с тетрадецильными и гексадецильными радикалами проявляли в основном бактериостатический эффект, полностью подавляя рост при значениях МИК. Для достижения бактерицидного действия против данного микроорганизма требовалось увеличение концентрации соединений более чем в 4 раза относительно их МИК. Данный ряд соединений также обладает фунгицидными свойствами на уровне препарата сравнения кетоконазола (МИК соединения 5б в отношении грибов *C. albicans* составила 7,9 мкМ). Однако алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды не проявили антибактериальной активности в отношении грамотрицательных бактерий (МИК всех соединений этого ряда превышает 1000 мкМ). Кроме того, данный ряд соединений продемонстрировал более низкую антимикробную активность против устойчивых штаммов *S. aureus*: МИК соединений этого ряда в отношении MRSA превышали МИК установленные для чувствительного тест-штамма в 2 или более раз.

3.2.2 Оценка селективности антимикробного действия исследуемых соединений

Селективное действие соединений на микробные клетки рассчитывалось как отношение IC_{50} на условно-нормальных клетках человека (Chang liver или RPMI 1788) или HC_{50} к МИК или МБК в отношении микробных клеток. Данные приведены в таблице 11 и таблице П1 приложения.

Таблица 11 – Индекс селективности соединений в отношении грамположительной бактерии *S. aureus*.

№ соединения	ИС					
	IC ₅₀ (RPMI 1788)/ МИК (<i>S. aureus</i>)	IC ₅₀ (RPMI 1788)/ МБК (<i>S. aureus</i>)	IC ₅₀ (Chang liver)/ МИК (<i>S. aureus</i>)	IC ₅₀ (Chang liver)/ МБК (<i>S. aureus</i>)	HC ₅₀ / МИК (<i>S. aureus</i>)	HC ₅₀ / МБК (<i>S. aureus</i>)
1a	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-
2a	1,0	0,5	1,7	0,9	-	-
3a	2,0	1,0	0,9	0,4	-	-
4a	0,7	0,4	0,7	0,4	-	-
5a	1,0	1,0	1,9	1,9	18,4	18,4
6a	3,5	3,5	4,2	4,2	19,6	19,9
7a	1,7	0,4	2,8	0,7	9,6	2,4
8a	3,6	1,8	4,6	2,3	8,5	4,2
1б	1,7	0,8	3,5	1,7	-	-
2б	0,6	0,6	2,3	2,3	-	-
3б	1,8	1,8	5,3	5,3	-	-
4б	19,6	4,8	45,7	11,3	50,5	12,5
5б	23,9	13,2	42,8	23,6	22,6	12,4
6б	10,8	2,6	11,8	2,8	15,1	3,7
7б	5,2	5,2	13,3	13,3	9,8	9,7
8б	0,3	0,2	0,6	0,3	2,0	1,0

(—) Определение ИС невозможно из-за низкой гемолитической активности соединений

Вещества первого ряда не продемонстрировали высокой селективности. ИС соединения лидера (8а) при сравнении с МИК_{*S. aureus*} =3,6 (относительно IC₅₀ RPMI 1788), 4,6 (относительно IC₅₀ Chang liver) и 8,5 (относительно HC₅₀). Однако за счет высокой активности в отношении бактерий *E. faecalis*, некоторые соединения проявляют высокую избирательность действия. Например, ИС соединения 8а при сравнении с МИК_{*E. faecalis*} =35,3 (относительно IC₅₀ Chang liver). Наибольшую селективность демонстрируют вещества второго ряда, а именно 4б, 5б, 6б (ИС >10). Относительно IC₅₀ для

гепатоцитоподобных клеток Chang liver ИС соединений 4б и 5б больше 40. Различия в селективности веществ обуславливается главным образом наименьшими значениями МИК и МБК алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлоридов по сравнению с веществами первого ряда. При этом, токсичность этих соединений на клетках человека не сильно отличается. Следует отметить низкую селективность соединений в отношении дрожжеподобных грибов *S. albicans*. Даже для соединения 5б ИС не превышал 10.

3.2.3 Исследование лекарственной резистентности

В течение длительного срока инкубации в присутствии небольших доз действующего вещества, у бактерий может вырабатываться устойчивость к этому соединению. Результаты исследования данного явления представлены на рисунке 25. Было показано, что даже после 17 пассажей и инкубации в присутствии веществ не было получено устойчивых мутантов *S. aureus*: в течение всего эксперимента для исследуемых фосфониевых солей не наблюдалось увеличение МИК более чем в 2 раза. В отличие от препаратов сравнения, МИК которых вырос более чем в 50 раз.

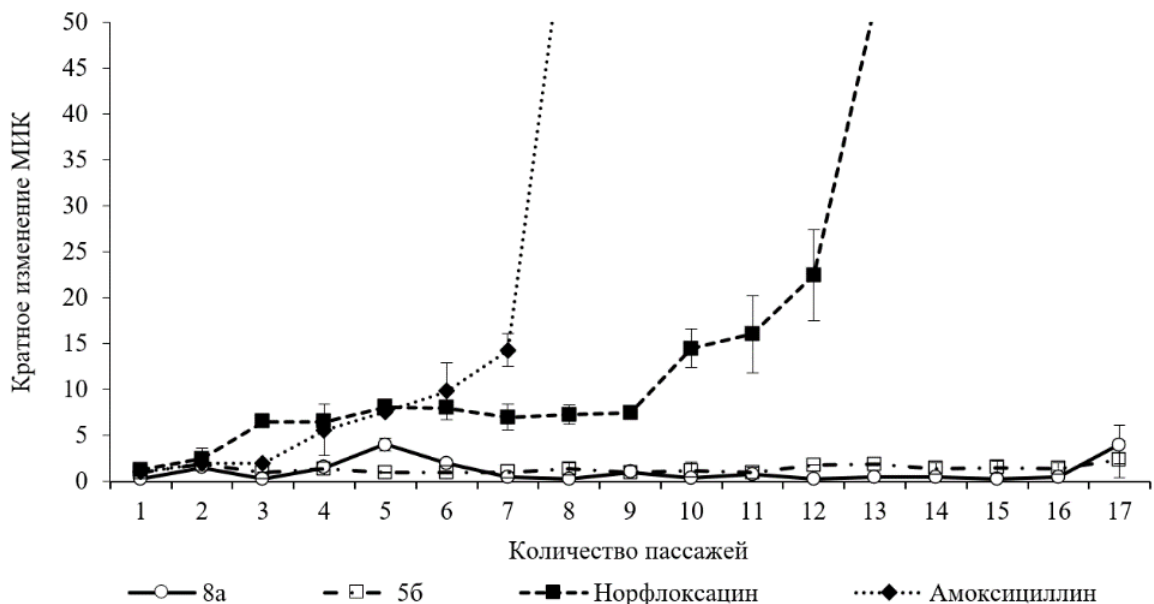


Рисунок 25 – Динамика изменения антимикробной активности исследуемых фосфониевых солей в отношении бактерий *S. aureus* в течение длительной инкубации.

3.2.4 Влияние исследуемых соединений на биопленки

Оценка плотности биопленки (окрашивание с помощью красителя CV) и метаболической активности бактериальных клеток в биопленке (окрашивание МТТ реagentом) продемонстрировала значительное предотвращение образования биопленок в присутствии исследуемых соединений 8a и 5b в концентрациях, близких к МИК ($1 \times \text{МИК}$ и $1/2 \times \text{МИК}$) (Рисунок 26). Причем не было значительных различий между двумя вышеописанными методами.

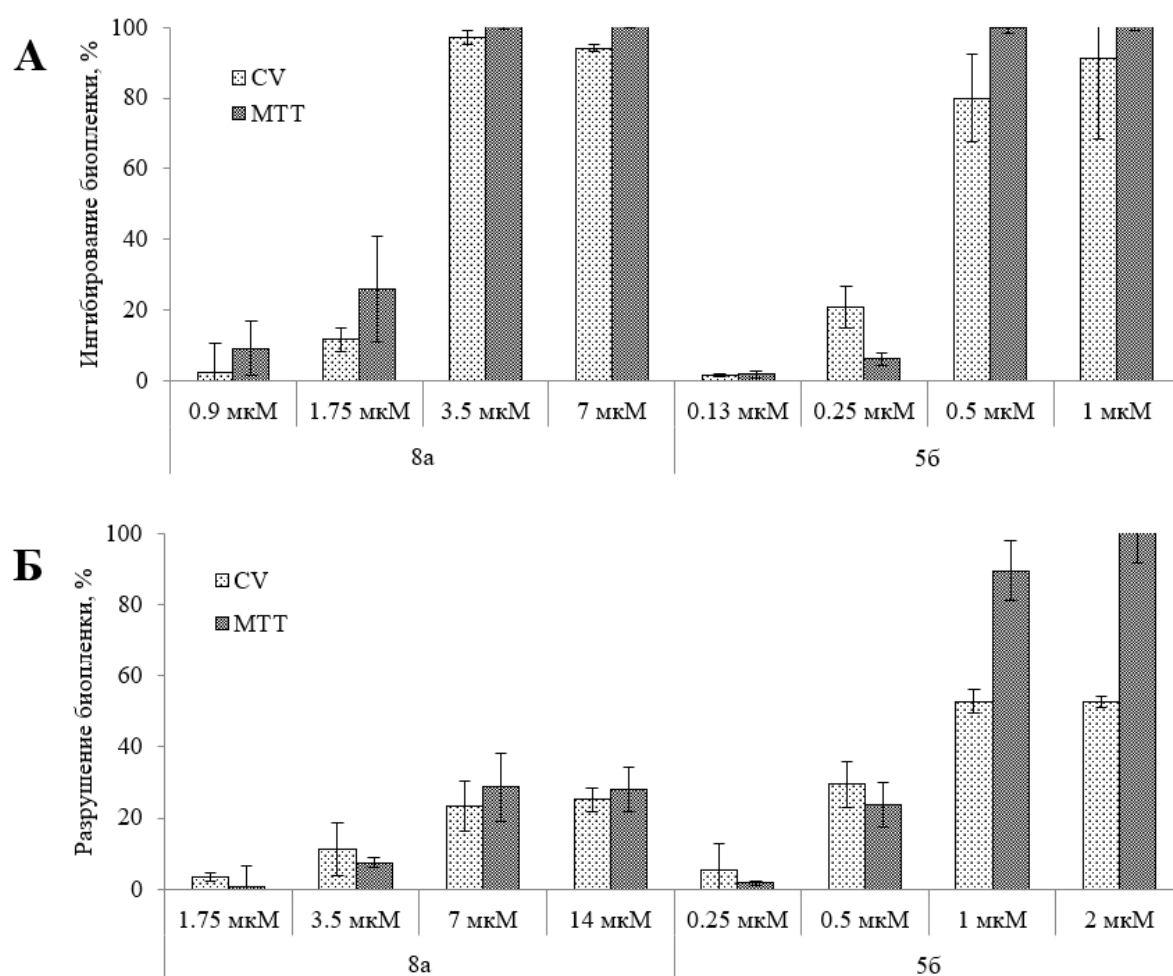


Рисунок 26 – Влияние исследуемых соединений на биопленки *S. aureus*. На диаграммах приведены значения подавления/ разрушение биопленки в расчёте % от контроля. С помощью красителя CV оценивали общую плотность биопленки. С помощью реagentа МТТ – метаболическую активность клеток в биопленке. А – ингибирование образования биопленки. Б- разрушение сформированной биопленки.

При оценке разрушения уже сформировавшейся биопленки значительный эффект был выявлен для соединения 5б в концентрациях, соответствующих МИК и 2×МИК. Стоит отметить, что наибольший процент разрушения биопленки был продемонстрирован с помощью окрашивания реагентом МТТ, т.е. при воздействии 5б в этих концентрациях наблюдается значительное снижение метаболически активных клеток в популяции до 89-100%. Причем окрашивание CV выявило лишь 52% разрушения биопленки.

Разрушение биопленок при воздействии соединения 8а в диапазоне исследуемых концентраций было продемонстрировано лишь на 25 %.

3.2.5 Исследования антимикробной активности фосфониевых солей по времени гибели

Результаты подсчета жизнеспособных колоний в разных временных точках при воздействии исследуемых соединений представлены на рисунке 27. Для обоих веществ даже через 30 мин инкубации заметен бактерицидный эффект. При воздействии 8а в концентрации 7 мкМ в течение первого часа инкубации разница составляет не более чем в 10 раз. При увеличении концентрации в 2, 4 в 10 раз было продемонстрировано резкое снижение КОЕ/мл в образцах после 30 мин инкубации. При этом соединения убивают все клетки *S. aureus* в образце уже после 2 ч воздействия. Причем не было выявлено существенной разницы между кинетикой гибели бактерий в присутствии 8а в концентрациях 28 мкМ и 70 мкМ. При обработке микроорганизмов веществом 5б в концентрациях 1 мкМ и 2 мкМ наблюдалась схожая динамика гибели бактерий. Полный бактерицидный эффект достигался через 4 ч (при 4 мкМ) или через 2 ч (при 10 мкМ).

3.2.6 Оценка влияния фосфониевых солей на целостность цитоплазматической мембраны бактерий

Усиление флуоресценции красителя PI свидетельствует о пермеабиллизации цитоплазматической мембраны бактерий в образце (рис. 28Б). Для обоих веществ было выявлено схожее дозозависимое увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны. Мембранотропный эффект

более выражен у соединения 5б. Однако значимое увеличение флуоресценции красителя PI наблюдается в присутствии всех протестированных веществ при 6,25 мкМ. Полученные данные также подтверждаются фотографиями, полученными с помощью флуоресцентного микроскопа (рис 28А).

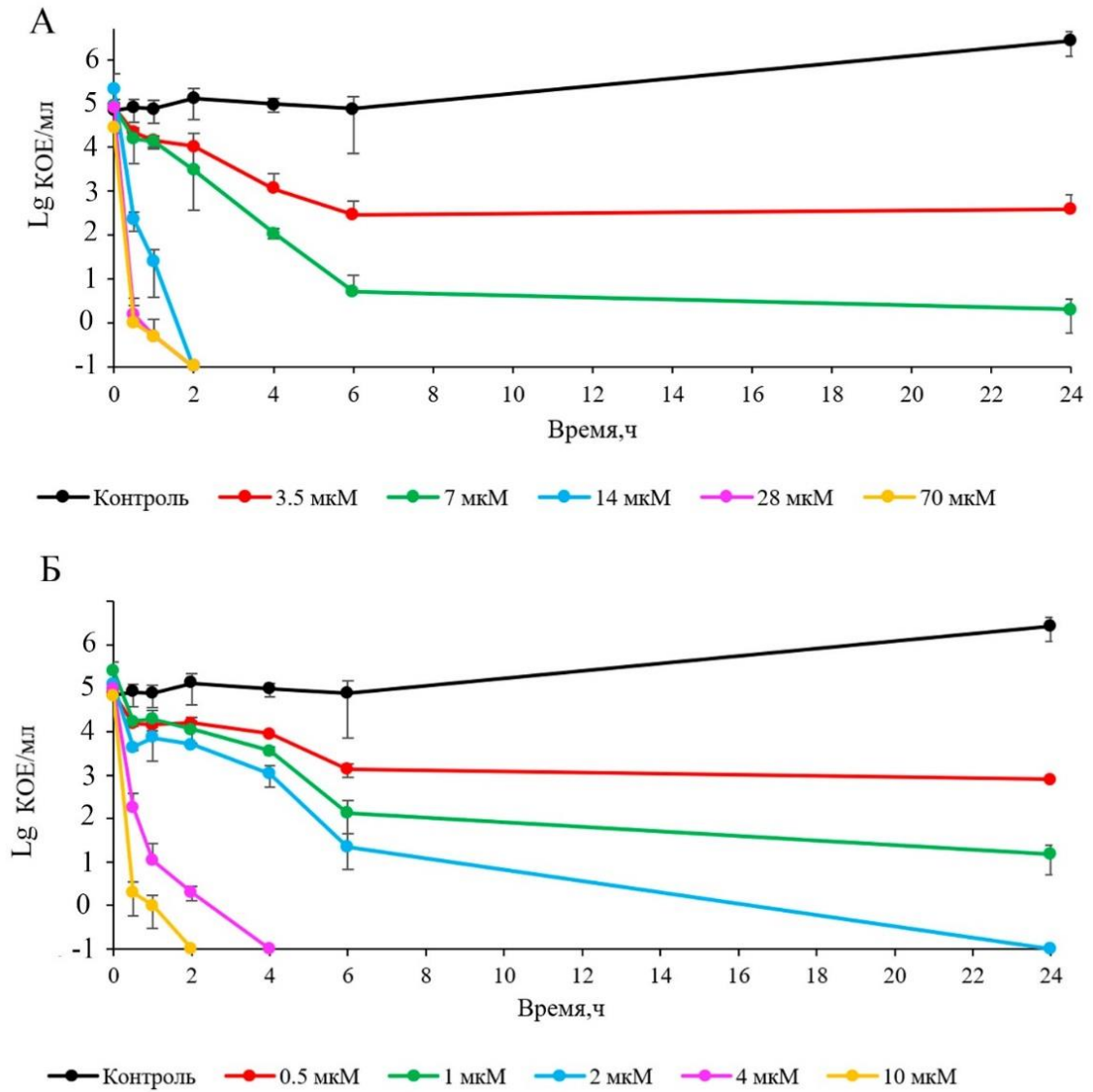


Рисунок 27 – Динамика снижения КОЕ/мл при воздействии разных концентраций соединений 8а (А) и 5б (Б) в течение суток.

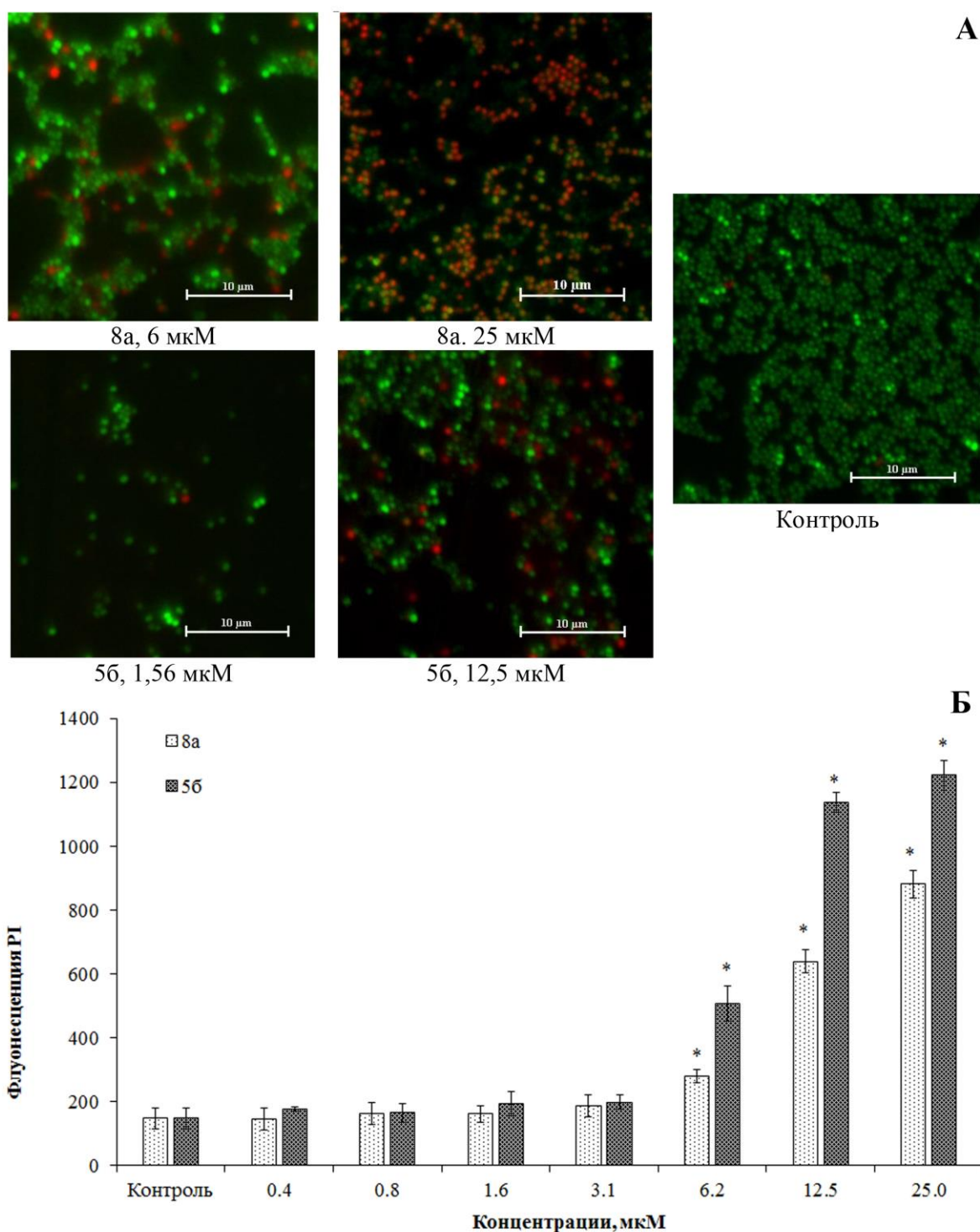


Рисунок 28 – Изменение проницаемости цитоплазматической мембраны бактерий *S. aureus* при воздействии соединений 8а и 5б. А – микрофотографии, полученные в результате окрашивания набором LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit. Б – Изменение флуоресценции красителя PI в клетках после воздействия соединений-лидеров. $p < 0,01$ при сравнении с контролем.

3.2.7 Оценка изменения мембранного потенциала бактерий

Снижение мембранного потенциала бактерий оценивали по изменению интенсивности флуоресценции красителя DiSC3(5). Значительное снижение $\Delta\Psi$ наблюдалось при воздействии веществ 8a и 5b в концентрациях 3,1 мкМ и более (рис. 29). Небольшое увеличение флуоресценции красителя DiSC3(5) было зафиксировано также в присутствии соединения 5b в концентрации 1.6 мкМ.

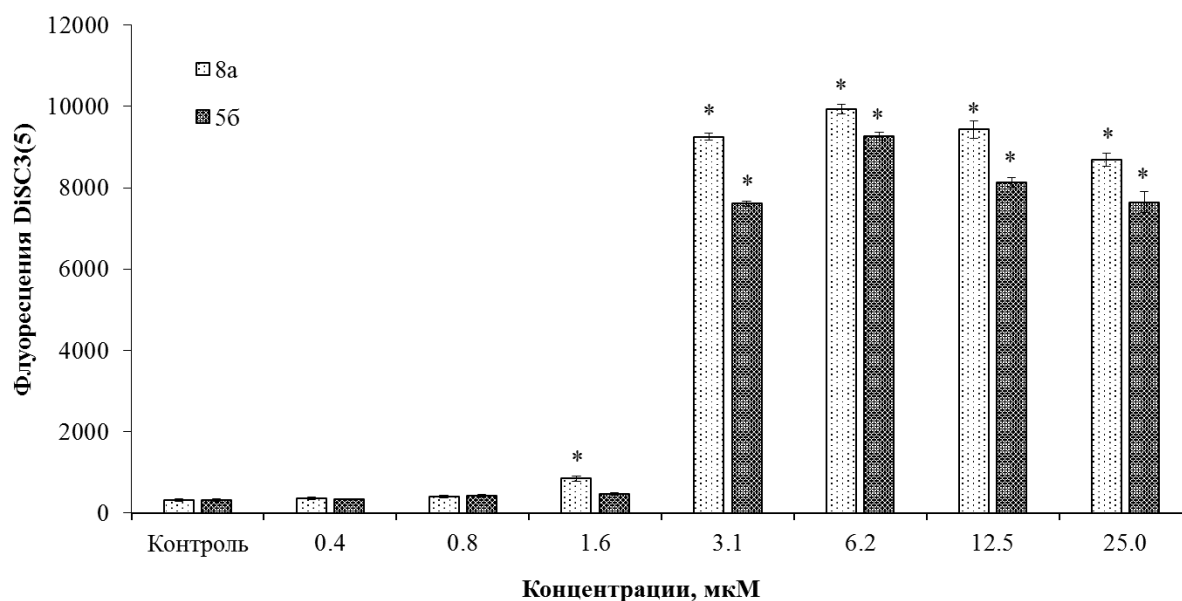


Рисунок 29 – Изменение мембранного потенциала бактерий *S. aureus* при воздействии соединений 8a и 5b, продемонстрированное в результате окрашивания клеток потенциал-зависимым красителем DiSC3(5). $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

3.2.8 Анализ морфологических изменений *S. aureus* методом ПЭМ

Анализ морфологических изменений в клетках бактерий *S. aureus* был осуществлен с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии на примере соединения 8a. При использовании данного метода, возможно визуализировать мембранные структуры клеток. В результате первичной фиксации и последующего окрашивания темные области соответствуют областям с высокой электронной плотностью, а светлые – с низкой [Kim *et al.*, 2007].

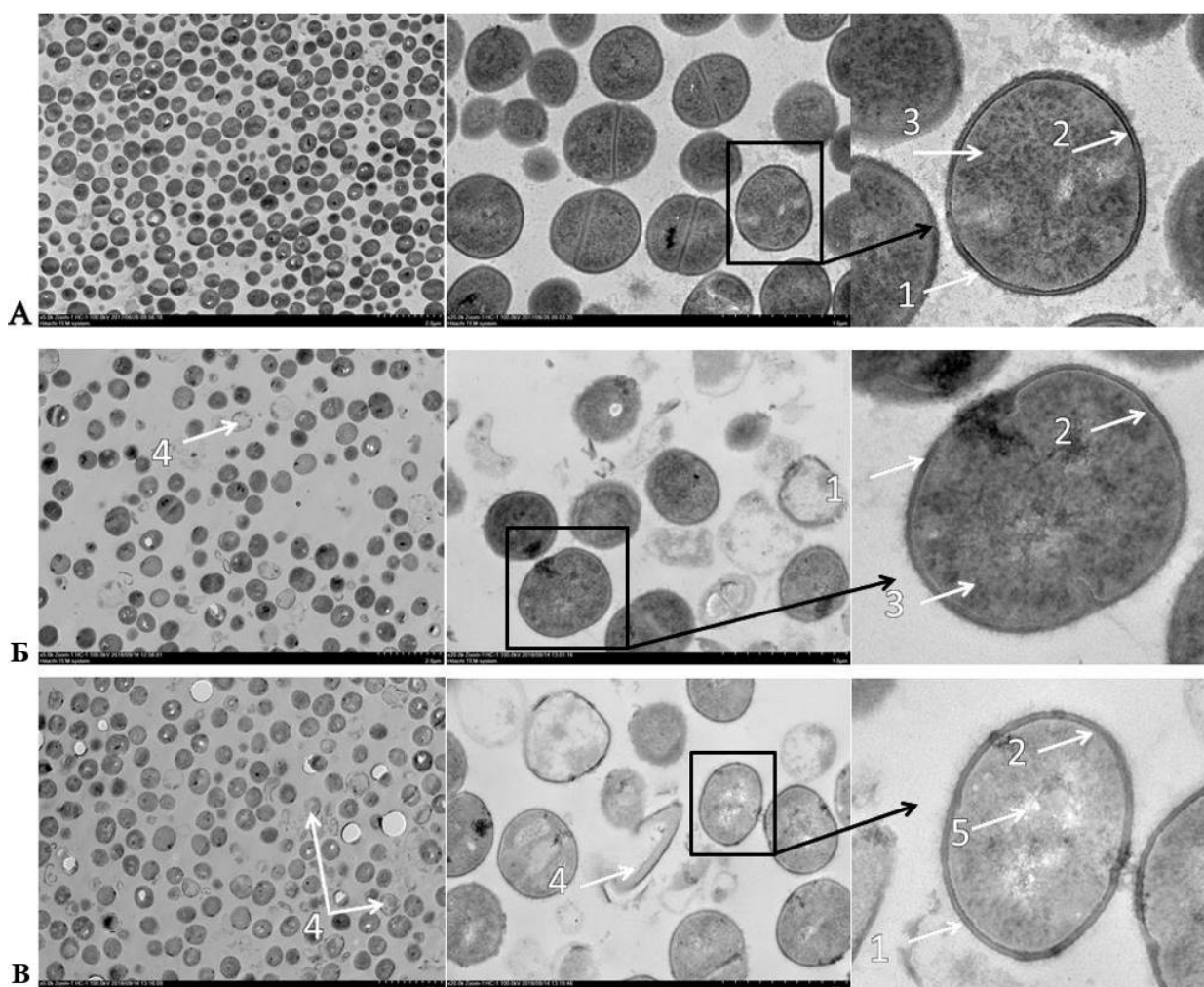


Рисунок 30 – Микрофотографии, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии. А – интактные клетки; Б- 8а (1×МИК); В – 8а (10×МИК); 1 – клеточная стенка; 2 – ЦПМ, 3 – цитоплазма, 4 – клетки в процессе лизиса, 5 – области с низкой электронной плотностью.

Необработанные клетки *S. aureus* (Рисунок 30А) имеют округлую форму, неповрежденную клеточную стенку, гладкую, четко выраженную цитоплазматическую мембрану. Цитоплазма интактных клеток представляет собой равномерную зернистую структуру. Такой вид цитоплазмы обычно наблюдается из-за рибосом и включений, которые четко видны в здоровой бактериальной клетке [Aruldass *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017].

При воздействии соединения 8а даже в малых концентрациях (1×МИК) (Рисунок 30Б) цитоплазма клеток становится гетерогенной, в образце присутствует множество разрушенных клеток. С увеличением концентрации

(до 10×МИК) (Рисунок 30В) равномерная зернистость, которая была в контроле, практически исчезает. Это говорит о нарушении процессов жизнедеятельности бактерий. Целостность ЦПМ нарушается при воздействии 8a в концентрации 10×МИК, мембрана становится неравномерной, почти незаметной.

Морфометрический анализ клеток *S. aureus* не выявил значительных изменений диаметра (Рисунок 31) клеток. Также не было отмечено значительного увеличения или снижения числа делящихся и начавших делиться клеток.

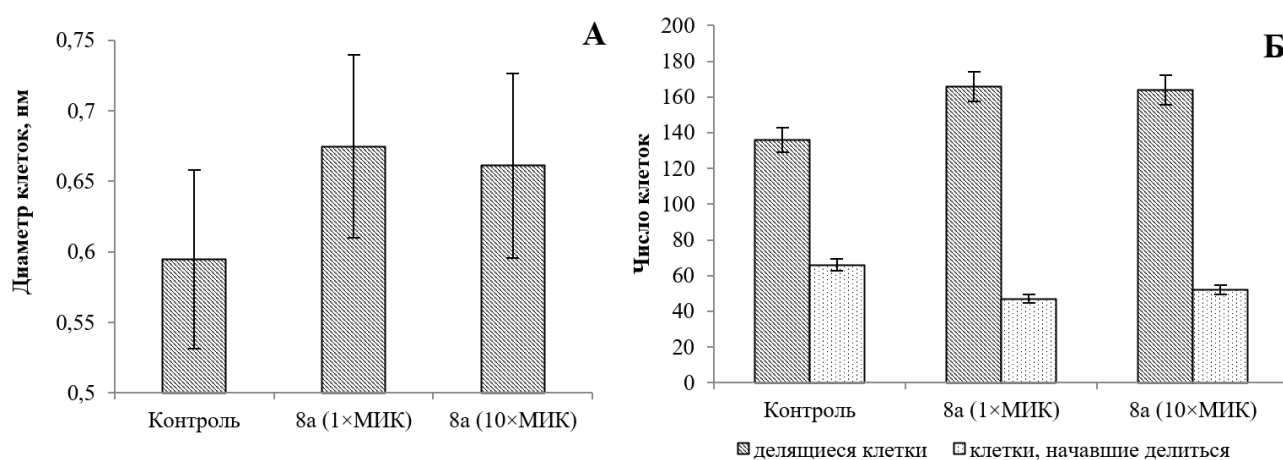


Рисунок 31 – Морфометрический анализ клеток *S. aureus*; А – диаметр клеток; Б – число делящихся и начавших деление клеток. Для сравнения результатов проводился пересчет данных для общего одинакового количества клеток в каждом из вариантов, принятого за 1000.

3.2.9 Анализ протеомного профиля *S. aureus*

Для выявления возможного механизма действия соединения-лидера 8a были проведены двумерный электрофорез в полиакриламидном геле и идентификация белков различия. Рисунок 32 представляет собой двумерное изображение геля, демонстрирующее сравнение протеомного профиля интактных клеток и клеток, обработанных соединением 8a (в концентрациях, соответствующих 1×МИК и 10×МИК). Белым цветом выделены достоверно

идентифицированные белки методом MALDI MS, наличие которых наблюдается только в присутствии соединения.

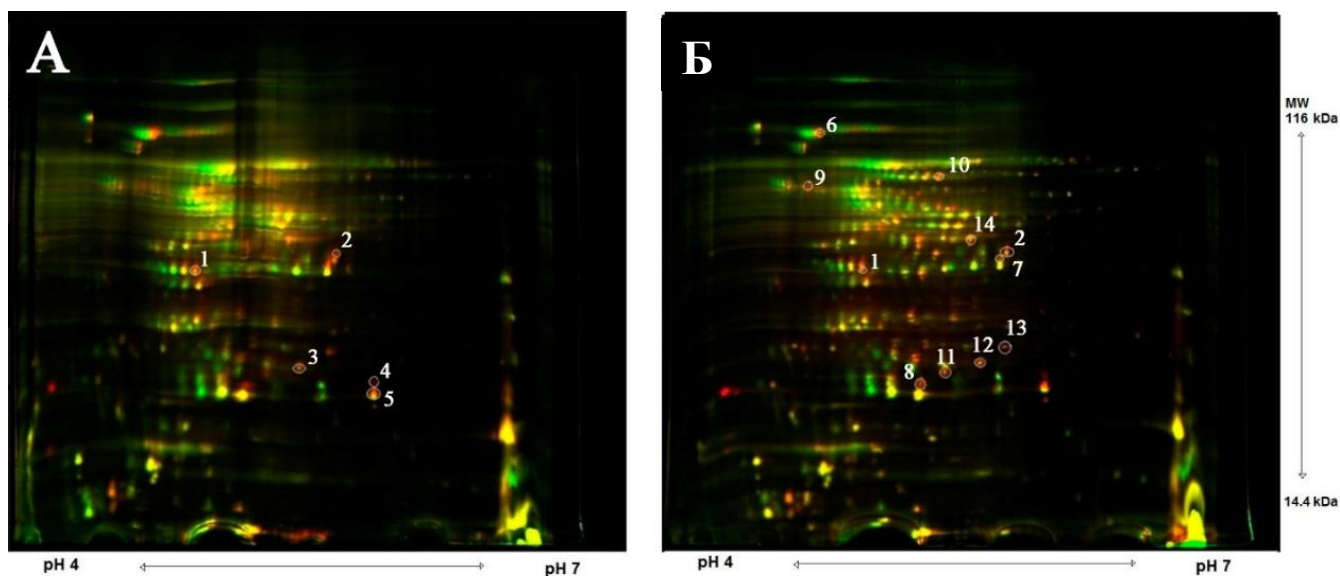


Рисунок 32 – Сканированное изображение двумерного геля протеома *Staphylococcus aureus*. А – 8а 1×МИК; Б- 8а 10×МИК.

При воздействии 8а выявлено большое количество белков, отсутствующих или имеющих в меньшем количестве в контрольном образце (окрашены красным). Кроме того, было замечено несколько белков, экспрессия которых прекращается в присутствии 8а (зеленое окрашивание). Были идентифицированы белки, количество которых сильно увеличивается при воздействии соединений (Таблица 12). К сожалению, достоверная идентификация некоторых белков по базе данных *Staphyl_aur_sub_aur* невозможна. Вероятно, это связано с воздействием соединений на молекулы белков, в результате чего изменяется молекулярная масса и изоэлектрическая точка белка.

Таблица 12 – Идентифицированные белки *S. aureus*, экспрессия которых увеличивается в присутствии соединения 8а.

№ белка	Наименование белка	Биологический процесс, в котором белок принимает участие/ функции белка	Наличие белка в клетках	
			1×МИК	10×МИК
1	Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза	Гликолиз	+	+
2	Метенилтетрагидрофолат циклогидролаза	Биосинтез аминокислот нуклеиновых кислот	+	+
3	Аргининдеиминаза	Метаболизм аминокислот	+	-
4	Молибдоптерин молибдентрансфераза	Биосинтез кофакторов	+	-
5	Универсальный стрессовый белок UspA	ответ на стресс	+	-
6	Пептидогликан гидролаза	деление, автолиз, рост регуляция синтеза клеточной стенки	-	+
7	Цистеин синтаза	метаболизм нуклеотидов, ответ на стресс	-	+
8	АТФ-зависимая ДНК-хеликаза RuvA	гомологичная рекомбинация	-	+
9	Енолаза	Гликолиз	-	+
10	Альдегиддегидрогеназа	Оксидоредуктазная активность, ответ на стресс	-	+
11	Тиоредоксин	Оксидоредуктазная активность, ответ на стресс	-	+
12	Глюкозамин-6-фосфат-изомераза	Гликолиз	-	+
13	3-кетоацил-АСР-редуктаза	Оксидоредуктазная активность, биосинтез жирных кислот	-	+
14	Этанол-активная дегидрогеназа/ ацетальдегид-активная редуктаза	Оксидоредуктазная активность, ответ на стресс	-	+

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.2 Цитотоксические свойства новых производных фосфониевых солей

В рамках исследования биохимических механизмов действия нового класса соединений нами были идентифицированы структуры, проявляющие наибольшую активность в качестве инструментов для воздействия на ключевые клеточные процессы. Оценка гемолитической активности веществ продемонстрировала, что при воздействии соединений первого ряда с короткими алкильными радикалами у атома фосфора (1а-4а) не наблюдалось сильного гемолиза, однако с увеличением липофильности молекулы (5а-8а) $IC_{50} = 58-70$ мкМ. Однако именно эти соединения продемонстрировали наибольшую антимикробную активность, в связи с чем селективность (ИС) в отношении бактерий *S. aureus* = 8,5 (для соединения 8а). Влияние длины алкильного радикала у атома фосфора на способность разрушать эритроциты наблюдается и для соединений второго ряда. В данном случае наиболее гемолитически активными оказались вещества 4б-7б $IC_{50} = 22-54$ мкМ.

Прослеживается также зависимость цитотоксичности соединений от длины алифатического заместителя при атоме фосфора. Кроме того, стоит отметить более высокую селективность соединений второго ряда. Наиболее активные вещества продемонстрировали IC_{50} в микромолярных концентрациях. Например, IC_{50} соединения-лидера 5б в отношении М-HeLa = 2,6 мкМ, $IC_{Ch. liver} = 16,4$.

Апоптоз — это процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на апоптотические тельца и посредством фагоцитоза поглощается близлежащими клеткам, не вызывая воспалительных процессов [Наумов, Булатецкий, 2021]. При изучении механизма противоопухолевого действия соединений был выявлен дозозависимый апоптоз. Причем и соединение 8а и 5б даже в концентрациях, превышающих IC_{50} приводили к увеличению клеток в состоянии раннего апоптоза. Различают внешний и внутренний путь апоптоза. Внешний

(рецепторный) путь протекает в результате взаимодействия проапоптотических сигнальных молекул с рецепторами, расположенными на ЦПМ, и последующей активации каскада каспаз. Внутренний (митохондриальный) путь опосредован активацией каскада каспаз, вызванной высвобождением проапоптотических белков из органелл клетки, таких как митохондрии. Внутренний путь может активироваться в результате экспрессии генов проапоптотических белков, например, Вах. В результате нарушения проницаемости митохондриальной мембраны, происходит высвобождение цитохрома С из митохондрий, который является основой для формирования апоптосомы, в состав которой также входят несколько молекул прокаспазы 9. После активации, инициаторная каспаза 9 в свою очередь активирует эффекторные каспазы 3, 6, 7 [Савицкая, Онищенко, 2015]. Из литературных источников известно, что фосфониевые соли могут накапливаться в митохондриях. Связи с этим было целесообразно выявить путь, по которому протекает апоптоз в клетках при воздействии соединений-лидеров 8а и 5б. Снижение потенциала митохондриальной мембраны может служить маркером внутреннего апоптоза.

Результаты продемонстрировали дозозависимое снижение митохондриального мембранного потенциала в клетках М-HeLa после обработки исследуемыми соединениями в концентрациях, соответствующих IC_{50} и превышающих ее вдвое. Причем наиболее сильное снижение $\Delta\Psi_m$ наблюдалось при воздействии вещества 8а. Таким образом, можно предположить, что вещества запускают апоптоз по внутреннему пути. Однако даже в процессе внешнего апоптоза снижается $\Delta\Psi_m$ в результате активации эффекторных каспаз и расщепления BID [Carneiro, El-Deiry, 2020].

Поэтому для подтверждения пути апоптоза был проведен мультиплексный анализ семи маркеров раннего апоптоза. Результаты данного анализа указывают на то, что апоптоз протекает по внутреннему пути активации каспазы 9, в котором гибель клеток происходит из-за дисфункции

митохондрий, а не по внешнему пути, связанному с активацией каспазы 8 [Green *et al.*, 2015].

Также в образцах, обработанных веществами в концентрациях, близких к IC_{50} , обнаружено небольшое увеличение белка Bad. Известно, что проапоптотический белок Bad связывается с антиапоптотическим белком Bcl-2, тем самым предотвращая гетеродимеризацию Bcl-2 с регулятором апоптоза Bax [Yang *et al.*, 1995]. В результате образуется димер Bax/Bax, который приводит к образованию протеолипидных пор, вызывая пермеабиллизацию внешней митохондриальной мембраны, высвобождению цитохрома C и апоптозу. [Edlich *et al.*, 2011]. Однако стоит отметить увеличение уровня маркера p53, который, как известно, запускает апоптоз в ответ на повреждения ДНК [Williams, Schumacher, 2016].

Производство энергии за счет окислительного фосфорилирования — это основная функция митохондрий. АФК генерируются в ходе нормального метаболизма, преимущественно в митохондриях. За счёт постоянно функционирующей антиоксидантной системы клетки, поддерживается их постоянное количество. Однако подавление компонентов механизма окислительного фосфорилирования, как известно, приводит к повышению производства супероксид-иона. Накопление активных форм кислорода может нарушить жизнедеятельность клетки (биохимические процессы, клеточные функции), т.к. они вызывают окисление липидов, белков и нарушение структуры ДНК, в результате чего клетка может перейти к процессу апоптоза [Reczek, Chandel, 2017]. АФК также могут служить сигнальными молекулами для регуляции многочисленных физиологических и биологических ответов, включая передачу сигналов фактора роста, пролиферацию и адаптацию к гипоксии. Однако в низких концентрациях АФК участвуют в клеточной сигнализации (действуют как мессенджеры в передаче сигнала в окислительно-восстановительных сигнальных путях), которая играет важную роль в функционировании клетки, в том числе влияет и на пролиферацию [Sabharwal, Schumacker, 2014]. Опухолевые клетки характеризуются

повышенным базальным уровнем АФК из-за гиперактивного метаболизма. За счёт этого они могут быть более уязвимыми к гибели, вызванной окислительным стрессом. В предыдущих экспериментах нами был подтвержден митохондриальный путь апоптоза в клетках после обработки соединениями 8a и 5b, т.е. отмечается воздействие соединений на митохондрии. Также, в литературе известны фосфониевые соли, в присутствии которых наблюдается повышенный уровень АФК [Dhanya *et al.*, 2017; Iksanova *et al.*, 2018]. Поэтому нами была изучена возможность исследуемых солей влиять на уровень АФК в раковых клетках M-HeLa. Результаты продемонстрировали значительное увеличение АФК, что еще раз подтверждает влияние веществ на митохондрии. Кроме того, известно, что накопление АФК может приводить к двухцепочечным разрывам ДНК. Ранее было продемонстрировано увеличение белка p53, который реагирует на повреждения ДНК, ведет к остановке клеточного цикла и в последствие приводит к апоптозу. Для понимания этого явления необходимо было изучить влияние исследуемых соединений на клеточный цикл.

В присутствии исследуемых соединений была продемонстрирована задержка клеточного цикла в фазе G1. Из чего следует, что вещества негативно влияют на пролиферацию клеток. В работах зарубежных и отечественных авторов также упоминаются фосфониевые соли, останавливающие клеточный цикл в этой фазе [Dhanya *et al.*, 2017].

Для оценки влияния соединений на пролиферацию клеток в режиме реального времени, было проведено исследование с использованием клеточного анализатора XCELLigence S16 Real-time Analysis System RTCA. В присутствии веществ в концентрациях, соответствующих IC_{50} наблюдается цитостатический эффект, гибель клеток происходит при более высоких концентрациях ($2 \times IC_{50}$). В течение первых пяти часов после внесения соединений наблюдается увеличение клеточного индекса (CI) выше контрольного уровня, а затем его снижение, что отражает окончательное цитотоксическое действие веществ. Более выраженный эффект наблюдается

при воздействии высоких концентраций ($2 \times IC_{50}$). Подобный характер изменения клеточного индекса описывают Abassi с соавторами для соединений ингибирующих трансляцию белков или влияющих на синтез ДНК. Известно также, что соединения этой категории вызывают остановку клеточного цикла в первую очередь при переходе из фазы G1 в S фазу [Abassi *et al.*, 2009]. Данный эксперимент не только подтверждает негативное влияние фосфониевых солей на пролиферацию клеток, но и подтверждает ранее полученные данные по нарушению клеточного цикла.

Так как в предыдущем опыте (п. 3.2.8) было показана индукция апоптоза в ответ на повреждение ДНК (было отмечено увеличение белка p53 в опытных образцах), было целесообразно изучить механизм данного воздействия. Мультиплексный анализ повреждения ДНК/ генотоксичности позволяет комплексно оценить наличие повреждений ДНК и ответ клетки на данные повреждения. Белки-маркеры, используемые в панели MILLIPLEX® MAP 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead играют различные ключевые роли в процессах передачи сигналов и репарации повреждений. Так, например, фосфорилированный H2A.X накапливается в местах двухцепочечных разрывов ДНК (DSB, double strand breaks) [Ismail, Hendzel, 2008], и часто считается их маркером [Abbas *et al.*, 2019]. В ответ на повреждения ДНК активируются внутриядерные киназы ATR и ATM, которые участвуют в сигнальных путях ДНК-репарации. ATR реагирует на одноцепочечную ДНК, которая может появляться в результате повреждений, вызванных агентами, блокирующими репликацию ДНК (например, УФ излучение) [Abraham *et al.*, 2001], а ATM на двухцепочечные разрывы [Smith *et al.*, 2010]. Субстратом ATR и ATM являются CHK1 и CHK2 киназы контрольных точек соответственно. Они останавливают клеточный цикл для того, чтобы клетка могла провести репарацию ДНК. CHK1 регулирует переход клетки в фазу митоза в то время, когда репликация ДНК затруднена. CHK2 активируется в ответ на DSB и активирует контрольную точку G1-S, которая регулирует переход клеток в S-фазу с помощью белка-супрессора опухоли

p53. p53 активирует ингибитор циклинзависимой киназы p21 [Manic *et al.*, 2015], в результате чего затрудняется G1/S переход [Karimian *et al.*, 2016]. Ингибитором p53 является проопухолевый белок MDM2 [Wang *et al.*, 2017].

Значительное увеличение белков ATR и H2AX после обработки исследуемыми соединениями, вероятно говорит о нарушении репликации и DSB, происходящих в клетке. Повреждения ДНК могут быть как следствием воздействия АФК, так и результатом влияния фенольной группы, входящей в состав исследуемых соединений. Известно, что фенолы в больших концентрациях могут приводить к DSB [Azqueta, Collins, 2016]. На повреждения ДНК реагирует p53, усиление флуоресценции которого наблюдается в опытных образцах. Несмотря на воздействие проопухолевого белка MDM2, наблюдается небольшое увеличение p53, который даже в малых концентрациях может активировать p21 [Желтухин, Чумаков, 2010]. Остановка клеточного цикла в фазе G1 подтверждается также и двумя методами, указанными выше.

4.1 Антимикробная активность новых производных фосфониевых солей

В результате скрининга новых производных фосфониевых солей было выявлено избирательное антибактериальное действие веществ на грамположительные бактерии (*S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*) на уровне препарата сравнения норфлоксацина. Кроме того, вещества также проявляли противогрибковую активность в отношении грибов *C. albicans*, при этом соединение 5б обладало активностью на уровне препарата сравнения кетоконазола. Антимикробные свойства исследуемых соединений по всей видимости обусловлены присутствием в структурах заряженной фосфониевой группы, соединенной с гидрофобными фенильными и алкильными радикалами. Такие вещества являются липофильными катионами, которые, как известно, способны проникать через мембрану микроорганизмов за счет высокого отрицательного трансмембранного потенциала [Ross *et al.*, 2006].

На грамотрицательные бактерии *E. coli* исследуемые соединения антимикробного эффекта практически не оказывали. Такие результаты согласуются с данными литературы. В большинстве работ активность фосфониевых солей в отношении грамотрицательных бактерий была сравнительно низкой или не была выявлена вовсе [Strobykina *et al.*, 2021; Chavarría *et al.*, 2023]. Вероятно, это связано с различием в строении клеточной стенки. По всей видимости, наружная мембрана грамотрицательных бактерий является барьером для липофильных катионов.

Антимикробная активность исследованных соединений против грамположительных бактерий высока и в большинстве случаев не уступает активности фосфониевых солей, описанных в литературе. (МИК наиболее активных фосфониевых производных в отношении *S. aureus* по литературным данным определяется в диапазоне 0,5-10 мкМ) [Nazarov *et al.*, 2023, Kumari *et al.*, 2019].

Все Дифенилалкил-2-гидроксифенилэтенилфосфоний хлориды проявили бактерицидное действие в отношении протестированных штаммов. Алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды также обладают бактерицидными свойствами, однако производные с длинным алкильным радикалом у атома фосфора (**76** и **86**) в отношении спорообразующих бактерий *B. cereus* продемонстрировали лишь бактериостатическую активность.

Анализ «структура-активность» показал, что антимикробные свойства исследуемых солей зависят от длины алкильного радикала, что влияет на липофильность молекулы в целом. Для оценки липофильности исследуемых соединений был рассчитан $\log P$ [Terekhova *et al.*, 2022], мера гидрофобности вещества, логарифм коэффициента распределения в системе н-октанол/вода. Химическое соединение считается гидрофильным при $\log P < 0$ и липофильным при $\log P > 0$ [Kharwar *et al.*, 2024]. В ряду дифенилалкил-2-гидроксифенилэтенилфосфоний хлоридов антибактериальная активность в отношении грамположительных бактерий растет с увеличением алкильного радикала у атома фосфора вплоть до октильного. (МИК соединений 5а-8а в

отношении бактерий *S. aureus* были в диапазоне от 3,6 до 7,5 мкМ). Однако пик противогрибковой активности приходится на соединения, содержащие пентильный или гексильный радикал (МИК 5а и 6а в отношении *C. albicans* = 29 мкМ). Показатель $\log P$ веществ 5а-8а = 7,36-8,63. Среди второй группы соединений наибольший как антибактериальный, так и противогрибковый эффект проявляет 5б. (МИК 5б в отношении *S. aureus* = 1 мкМ, в отношении *C. albicans* = 7,9, $\log P$ = 8,55). При этом для всех протестированных фосфониевых солей, чьи МИК были более 10 мкМ на всех протестированных штаммах $\log P$ оказался <7 или >9,5. Также вклад в антимикробную активность может приносить фенольный фрагмент. Известно, что антимикробное действие фенолов может быть связано с нарушением ЦПМ, ингибированием синтеза белка [Lucchini *et al.*, 1990]. Фенолы могут обладать как антиоксидантными, так и прооксидантными свойствами [Procházková *et al.*, 2011].

Суммируя вышесказанное, среди каждого ряда соединений можно выделить соединения-лидеры, обладающие наибольшим антимикробным эффектом. Среди веществ первого ряда такими соединениями являются 5а, 6а, 7а, 8а. Эти вещества продемонстрировали высокую антимикробную активность в отношении всех протестированных штаммов грамположительных бактерий. Для дальнейших исследований было выбрано соединение 8а. Среди производных второго ряда наиболее активными являются 4б и 5б. Для дальнейших исследований было выбрано соединение 5б, при атоме фосфора имеющее додецильный радикал. При сравнении двух рядов соединений можно заключить, что Дифенилалкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды обладают более выраженным бактерицидным эффектом и более эффективны против устойчивых штаммов золотистого стафилококка. Алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды продемонстрировали более низкие значения МИК на грамположительных бактериях и обладают более сильным фунгицидными свойствами. Стоит отметить, что несмотря на близкие значения $\log P$, антимикробная активность

соединений-лидеров отличается. Вероятно, меньший размер молекулы и большая биодоступность (лучшая растворимость) алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлоридов обуславливают наилучшие антимикробные свойства.

Дальнейшее углубленное исследование механизма антимикробного действия проведено на штамме *Staphylococcus aureus 209P* как наиболее чувствительном к действию соединений репрезентативном объекте в пределах выявленного спектра активности против грамположительных бактерий.

Одной из главных проблем в применении антибиотиков является возникновение устойчивых штаммов микроорганизмов. Одними из наиболее известных являются MRSA. Исходя из этого, было целесообразно оценить активность исследуемых фосфониевых солей на устойчивые штаммы *S. aureus*. В этом исследовании были использованы два штамма: MRSA-1 – штамм *S. aureus*, устойчивый к β -лактамным антибиотикам и фторхинолонам, другой штамм MRSA-2 – устойчивый только к β -лактамным антибиотикам. Производные первого ряда продемонстрировали высокую бактерицидную активность в отношении протестированных MRSA на уровне активности в отношении стандартного лабораторного штамма. МИК и МБК соединений второго ряда в отношении MRSA оказались в 2-8 раз выше, чем для *S. aureus 209P*. При этом МИК полученные для антибиотиков ципрофлоксацина и амоксициллина в отношении резистентных штаммов превышали МИК для музейной культуры более чем в 200 и 100 раз соответственно.

При исследовании новых потенциальных антимикробных агентов необходимо исключить возможность развития резистентности у стандартного лабораторного штамма в течении нескольких дней инкубации. При инкубации микроорганизмов в среде с содержанием низких концентраций антимикробных агентов, бактерии со временем могут выработать устойчивость к этим веществам, как это было продемонстрировано с препаратами сравнения (Амоксициллин, Норфлоксацин). При воздействии исследуемых фосфониевых солей (8а и 5б) были зафиксированы МИК не

более чем в 2 раза превышающие МИК для эталонного штамма *S. aureus* ATCC209P. В литературе такое явление иногда объясняется неспецифическим механизмом действия соединения [Lin *et al.*, 2017]. В ряду литературных источников описываются фосфониевые соли, которые не вызывали развитие резистентности [Michaud *et al.*, 2022].

Для оценки эффективности исследуемых соединений против микроорганизмов важно учитывать взаимодействие веществ с биопленками. После воздействия соединений 8a и 5b было продемонстрировано почти полное ингибирование образования биопленок в концентрациях, соответствующих $1/2 \times \text{МИК}$ и выше. При изучении разрушения сформировавшихся биопленок, были выявлены различия между исследуемыми соединениями: 8a даже в концентрации, превышающей МИК (14 мкМ) не приводило к значительному разрушению биопленки. При этом при воздействии 5b в концентрации 1 мкМ (что соответствует МИК) наблюдается значительное снижение жизнеспособных клеток в биопленке, а при более высокой концентрации практически полное их отсутствие. Однако стоит отметить, что результаты, полученные окрашиванием биопленки CV, не продемонстрировали столь значительного эффекта по сравнению с МТТ. Вероятно, это связано с взаимодействием красителя с веществами во внеклеточном матриксе и мертвыми клетками. Таким образом, можно заключить, что соединение 5b эффективно даже против сформировавшихся биопленок *S. aureus*.

Анализ для выявления МИК и МБК соединений позволяет оценить антибактериальное действие соединений лишь после длительного периода инкубации с веществами. Оценка времени гибели микроорганизмов позволяет проанализировать и выявить срок, необходимый исследуемому соединению для достижения бактериостатического и бактерицидного эффекта. Соединение 8a приводит к полной гибели бактерий через 2 часа после воздействия в концентрации 14 мкМ ($2 \times \text{МИК}$) и выше, а соединение 5b – в концентрации 10 мкМ ($10 \times \text{МИК}$).

Известно, что фосфониевые соли, как липофильные катионы, способны проникать через ЦПМ, в связи с чем были изучены мембранотропные свойства веществ: пермеабилитация (оценивалось изменение флуоресценции красителя PI в клетках) и деполяризация (оценивалось изменение флуоресценции красителя DiSC3(5) в клетках) мембраны. Деполяризация происходит за счет нарушения движения ионов через мембрану, а нарушение проницаемости из-за значительных повреждений мембраны или образования крупных пор [Voix-Lemonche *et al.*, 2020]. Результаты исследования демонстрируют небольшие нарушения ЦПМ при воздействии веществ 8а и 5б, которые при повышении концентрации усугубляются. Назаров с соавторами в серии работ описывают фосфониевые соли, способные вызывать деполяризацию ЦПМ бактерий, но при этом не наблюдалось изменения проницаемости мембраны [Nazarov *et al.*, 2021; Pavlova *et al.*, 2021]. В другом исследовании фосфониевые соли вызывали как деполяризацию, так и пермеабилитацию бактериальной мембраны [Li *et al.*, 2017].

По фотографиям, полученным методом ПЭМ, можно подтвердить воздействие веществ на ЦПМ бактерий (в концентрации 10×МИК мембрана становится аморфной, плохо заметной структурой). Однако во всех образцах (даже в разрушенных клетках) клеточная стенка остается четко различимой. В литературе встречаются работы, которые демонстрируют воздействие соединений на клеточную стенку. Kang с коллегами сообщают об исследовании модифицированного антибиотика ципрофлоксацина трифенилфосфониевым фрагментом посредством сложноэфирного и амидного сочетания. При изучении морфологии бактерий методом ПЭМ в данном случае присутствие трифенилфосфониевого фрагмента приводит к нарушению целостности клеточной стенки бактерий *S. aureus*, изменению ее структуры, размера [Kang *et al.*, 2020]. О нарушении клеточной стенки при воздействии производных фосфониевых солей также сообщают Никитина с соавторами [Nikitina *et al.*, 2017]. В настоящей работе эффект соединений

резко отличается: пептидогликановый слой даже в высоких концентрациях остается четко выраженной структурой, причем даже после лизиса сохраняются фрагменты клеточной стенки. Таким образом, можно заключить, что бактерицидное действие веществ связано не с нарушением целостности клеточной стенки.

В неблагоприятных условиях бактерия пытается синтезировать белки, которые могут помочь ей пережить состояние стресса. Выделив и идентифицировав такие белки, можно сделать вывод о характере воздействия фосфониевых соединений на клетки. В нашем случае было выявлено несколько белков, которые обычно синтезируются в клетке в условиях стресса (универсальный стрессовый белок UspA, альдегид дегидрогеназа, тиоредоксин, 3-кетоацил-АСР-редуктаза, этанол-активная дегидрогеназа/ацетальдегид-активная редуктаза, цистеин синтаза) при этом только универсальный стрессовый белок UspA был достоверно идентифицирован в концентрации, соответствующей МИК. Остальные белки присутствовали только в более высоких концентрациях. Белок UspA содержится в бактериях, археях, грибах, простейших и растениях, его экспрессия индуцируется различными стрессовыми факторами среды, такими как голодание, экстремальные температуры, антибиотики и другие. Известно, что регуляция гена UspA связана с путями углеводного метаболизма, в том числе гликолиза. Кроме того, экспрессия этого белка увеличивается при условиях, в которых рост популяции перестает быть максимальным. Механизмы действия данного белка еще не до конца известны, но основная функция UspA — это борьба со стрессом [Persson *et al.*, 2007].

Судя по идентифицированным белкам, которые участвуют в синтетических процессах, можно заключить, что в клетке увеличивается интенсивность пластического и энергетического метаболизма. Также был выделен белок, участвующий в гомологичной рекомбинации. Это процесс обмена генетической информации между гомологичными участками ДНК, который способствует восстановлению двухцепочечных разрывов,

горизонтальной передачи генов, увеличивает генетическое разнообразие популяции [Kaniieski *et al.*, 2018]. Кроме того, вызывает интерес белок пептидогликан гидролаза (6), влияющий на состояние клеточной стенки бактерий. Этот фермент участвует в регуляции синтеза клеточной стенки, обороте пептидогликана во время роста, отделении дочерних клеток во время деления клеток и автолизе [Bobrovskyy *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2015; Szweda *et al.*, 2012]. Так как, по данным ПЭМ в морфометрических исследованиях не было выявлено увеличение числа делящихся клеток или их размера, можно предположить, что в данном случае этот белок участвует в процессе автолиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное комплексное исследование позволило установить фундаментальные биохимические закономерности действия новых производных фосфониевых солей. Ключевым результатом работы стало выявление детерминирующей роли липофильности молекул, определяемой длиной алкильного радикала, в проявлении как цитотоксической, так и антимикробной активности. Также показано, что введение в структуру молекулы более компактного гидроксibenзильного фрагмента способствует усилению биологической активности соединений без повышения их токсичности в отношении условно-нормальных клеточных линий. Установлено, что соединения-лидеры демонстрируют селективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, реализуемую через каскад взаимосвязанных биохимических событий: деполяризацию мембраны митохондрий, индукцию окислительного стресса, повреждение ДНК и последующий запуск апоптоза по митохондриальному пути. Параллельно продемонстрирован универсальный мембранотропный механизм антимикробного действия, объясняющий высокую бактерицидную активность соединений против резистентных штаммов и биопленок *Staphylococcus aureus* без развития резистентности.

Полученные данные не только вносят вклад в понимание молекулярных основ биологической активности фосфониевых солей, но и создают научный фундамент для целенаправленного дизайна новых соединений с заданными свойствами – селективных противоопухолевых агентов с сопутствующей антимикробной активностью.

ВЫВОДЫ

1. Установлен спектр цитотоксической активности новых производных фосфониевых солей *in vitro*: выявлены соединения-лидеры, обладающие селективным действием в отношении некоторых опухолевых клеточных линий человека при низкой гемотоксичности и цитотоксичности на условно-нормальных клетках.
2. Охарактеризованы ключевые биохимические события цитотоксического механизма соединений-лидеров в опухолевых клетках: деполяризация мембраны митохондрий, индукция окислительного стресса, повреждение ДНК, остановка клеточного цикла в G1-фазе и запуск апоптоза по митохондриальному пути.
3. Охарактеризована высокая антимикробная активность исследуемых фосфониевых солей, проявляющаяся в отношении грамположительных бактерий (включая MRSA), грибов, а также их эффективность против биопленок и отсутствие развития резистентности у *Staphylococcus aureus in vitro*.
4. Установлен мембранотропный механизм антимикробного действия, заключающийся в деполяризации и последующей пермеабиллизации цитоплазматической мембраны бактерий, что подтверждается данными протеомного анализа, выявившего нарушения в ключевых метаболических путях.
5. Основным структурным фактором, влияющим на биологическую активность исследуемых соединений, является длина алкильного радикала у атома фосфора. Введение в структуру молекулы более компактного гидроксибензильного фрагмента (алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды) способствует усилению биологической активности соединений без повышения их токсичности в отношении условно-нормальных клеточных линий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- УПП – устойчивость к противомикробным препаратам
- ВОЗ – всемирная Организация Здравоохранения
- ESKAPE – патогены *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* sp.
- ЛС – лекарственные средства
- АФК – активные формы кислорода
- ЭТЦ – электрон-транспортной цепью
- $\Delta\Psi_m$ – митохондриальный мембранный потенциал
- ЧФС – четвертичные фосфониевые соли
- ТФФ⁺ – катион трифенилфосфония
- $\Delta\Psi$ – мембранный потенциал
- ЦПМ – цитоплазматическая мембрана
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- MRSA – метициллин-резистентный штамм *S. aureus*
- ЧАС – четвертичные аммониевые соединения
- IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования
- QSAR – количественная взаимосвязь «структура-активность» (quantitative structure of activity relationship)
- СК – салициловая кислота
- АСК – ацетилсалициловая кислота
- МБК – минимальная бактерицидная концентрация
- МФК – минимальная фунгицидная концентрация
- ДМСО – диметилсульфоксид
- CV – краситель кристаллический фиолетовый
- МТТ – 3-(4,5- Диметилтиазол-2-ил)-2,5- дифенилтетразолия бромид
- PI – йодид пропидия
- DiSC3(5) – 3',3'-дипропилтиадикарбоцианин

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

PBS – фосфатно-солевой буфер

CI – клеточный индекс

HC50 – концентрация, при которой наблюдается разрушение 50% эритроцитов

ИС – индекс селективности

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антоненко Ю. Н. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения 1. Катионные производные пластохинона: синтез и исследование *in vitro* / Ю. Н. Антоненко, А. В. Аветисян, Л. Е. Бакеева, Б. В. Черняк, В. А. Чертков, Л. В. Домнина, О. Ю. Иванова, Д. С. Изюмов, Л. С. Хайлова, С. С. Клишин, Г. А. Коршунова // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – №. 12. – С. 1589-1606.
2. Желтухин А. О. Повседневные и индуцируемые функции гена *p53* / А. О. Желтухин, П. М. Чумаков // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 447-516.
3. Науменко З. С. Устойчивость *Staphylococcus aureus* к антибактериальным препаратам / З. С. Науменко, Л. В. Розова // Гений ортопедии. – 2007. – №. 2. – С. 36-38
4. Наумов М. Д. Апоптоз: физиология или патология, роль в современной медицине / М. Д. Наумов, С. В. Булатецкий // Фундаментальная наука в современной медицине. – 2021. – V. 43. - №. 2. – С. 467-471.
5. Пиневиц А. В. Микробиология. Биология прокариотов Учебник в 3 т. Том 1. / А. В. Пиневиц. – С.-Петербург. – Издательство С.-Петербургского Университета, 2006 – 352с. – ISBN 5-288-04057-5 (т.1).
6. Пурдела Д. Химия органических соединений фосфора: [Пер. с рум] / Д. Пурдела, Р. Вылчану. – Москва : Химия, 1972. – 752с. – Перевод изд: *Chimia compușilor organici ai fosforului și ai acizilor lui* / D. Purdela, R. Vilceanu. – Bucharest : Academici, 1965.
7. Савицкая М. А. Механизмы апоптоза (обзор) / М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко // Биохимия. - 2015. – V. 80. - №. 11. – С. 1613-1627.
8. Савицкая М. А. Механизмы апоптоза (обзор) / М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко // Биохимия. – 2015. – V. 80. – №. 11. – С. 1613-1627.
9. Трифенилфосфониевые соли лупановых тритерпеноидов, способ получения и применение в качестве противоопухолевых веществ: пат. RU2576658C2 Рос. Федерация : C07F9/54, A61P35/00, A61K31/66 / А. Ю.

Спивак, В. А. Хазанов В. А, В. Н. Одинокоев, Н. В. Бельская, Р. Р. Халитова, Э. Р. Шакурова, Р. Р. Губайдуллин, С. А. Станкевич, У. М. Джемилев, Д. А. Недопекина, Ю. П. Бельский; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт нефтехимии и катализа Российской академии наук ; заявл. 12.11.2012 ; опубл. 20.05.2014, 32с.

10. Устойчивость к противомикробным препаратам 2020 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (дата обращения 04.02.2024)

11. ААТ Bioquest, Inc [Электронный ресурс]. URL: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (дата обращения 18.01.2021)

12. Abassi Y. A. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects / Y. A. Abassi, B. Xi, W. Zhang, P. Ye, S. L. Kirstein, M. R. Gaylord, S. C. Feinstein, X. Wang, X. Xu // *Chemistry & biology*. – 2009. – Т. 16. – №. 7. – С. 712-723.

13. Abbas I. In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation / I. Abbas, G. Badran, A. Verdin, F. Ledoux, M. Roumie, J.-M. L. Guidice, D. Courcot, G. Garçon // *Environmental research*. – 2019. – V. 171. – С. 510-522.

14. Ahmad S. J. Mode of action of endophytic *Streptomyces* sp., SUK 25 extracts against MRSA; microscopic, biochemical and time-kill analysis / S. J. Ahmad, H. H. Lian, D. F. Basri, N. M. Zin // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* – 2015. – V. 30. – С. 11-17.

15. Akshay R. P. Synthesis and Biological Activity of Azine Heterocycle Functionalized Quaternary Phosphonium salts / R. P. Akshay, S. Karagam // *Materials Science and Engineering Conference Series*. – 2017. – V. 263. – №. 2. – E. 022017

16. Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit [Электронный ресурс]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/references/protocols/cell-and-tissue->

[analysis/flow-cytometry-protocol/apoptosis/alexa-fluor-488-annexin-v-dead-cell-apoptosis-kit.html](#) (дата обращения 14.12.2023)

17. Alkhaldi A. A. M. Trypanocidal action of bisphosphonium salts through a mitochondrial target in bloodstream form *Trypanosoma brucei* / A. A. M. Alkhaldi, J. Martinek, B. Panicucci, C. Dardonville, A. Zíková, H.P. Koning // *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 23-34.

18. Alonso B. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm / B. Alonso, R. Cruces, A. Pérez, C. Sánchez-Carrillo, M. Gueembe // *Journal of microbiological methods*. – 2017. – V. 139. – С. 135-137.

19. Amoeba-killing agent, method for controlling amoeba and method for sterilizing legionellaceae bacterium: пат. JP2002308713A Japan / Tomoo I., Masayo I., Biyuuki K. ; заявитель и патентообладатель Aquas Corp, K I Chemical Industry Co Ltd ; заявл. 11.04.2001; опубл. 23.10.2002, 12 с.

20. Ansari W.A. Reactive oxygen species (ROS): sources, generation, disease pathophysiology, and antioxidants / W.A. Ansari, K. Srivastava, M. Nasibullah, M. F. Khan // *Discov. Chem.* - 2025. – V. 2. - №. 1. – С. 191.

21. Aruldass C. A. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / C. A. Aruldass, S. R. L. Masalamany, C. K. Venil, W. A. Ahmad // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2018. – Т. 25. – №. 6. – С. 5164-5180.

22. Azqueta A. Polyphenols and DNA damage: A mixed blessing / A. Azqueta, A. Collins // *Nutrients*. – 2016. – V. 8. – №. 12. – С. 785.

23. Bachowska B. High Cytotoxic Activity of Phosphonium Salts and Their Complementary Selectivity towards HeLa and K562 Cancer Cells: Identification of Tri-n-butyl-n-hexadecylphosphonium bromide as a Highly Potent Anti-HeLa Phosphonium Salt / B. Bachowska, J. Kazmierczak-Baranska, M. Cieslak, B.

Nawrot, D. Szczęsna, J. Skalik, P. High Bałczewski // *ChemistryOpen*. – 2012. – V. 1. – №. 1. – P. 33-38.

24. Begum H. M. Intracellular and microenvironmental regulation of mitochondrial membrane potential in cancer cells / H. M. Begum, K. Shen // *WIREs Mechanisms of Disease*. – 2023. – V. 15. – №. 3. – C. e1595.

25. Benarroch J. M. The microbiologist's guide to membrane potential dynamics / J. M. Benarroch, M. Asally // *Trends in microbiology*. – 2020. – V. 28. – №. 4. – C. 304-314.

26. Bittner Fialová S. Derivatization of rosmarinic acid enhances its in vitro antitumor, antimicrobial and antiprotozoal properties / S. B. Fialová, M. Kello, M. Čoma, L. Slobodníková, E. Drobná, I. Holková, M. Garajová, M. Mrva, V. Zachar, M. Lukáč // *Molecules*. – 2019. – V. 24. – №. 6. – C. 1078.

27. Bobrovskyy M. EssH peptidoglycan hydrolase enables *Staphylococcus aureus* type VII secretion across the bacterial cell wall envelope / M. Bobrovskyy, S. E. Willing, O. Schneewind, D. Missiakas // *Journal of bacteriology*. – 2018. – T. 200. – №. 20. – C. 10.

28. Boix-Lemonche G. A rapid fluorescence-based microplate assay to investigate the interaction of membrane active antimicrobial peptides with whole gram-positive bacteria / G. Boix-Lemonche, M. Lekka, B. Skerlavaj // *Antibiotics*. – 2020. – V. 9. – №. 2. – C. 92.

29. Bostwick D. G. Chapter 32 - Prostate / D. G. Bostwick, I. Meiers // *Modern Surgical Pathology (Second Edition)*. – 2009. – C. 1121-1180.

30. Browne K. A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides / K. Browne, S. Chakraborty, R. Chen, M. D. Willcox, D. S. Black, W. R. Walsh, N. Kumar // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – V. 21. – №. 19. – C. 7047

31. Brunel F. Antibacterial activities of mono-, di- and tri-substituted triphenylamine-based phosphonium ionic liquids / F. Brunel, C. Lautard, C. Di Giorgio, F. Garzino, J. M. Raimundo, J. M. Bolla, M. Camplo // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2018. – V. 28. – №. 5. – P. 926-929.

32. Cairns A. G. Targeting mitochondria with small molecules: the preparation of MitoB and MitoP as exomarkers of mitochondrial hydrogen peroxide / A. G. Cairns, S. J. McQuaker, M. P. Murphy, R. C. Hartley // *Mitochondrial medicine*. – Humana Press, New York, N. - 2015. – P. 25-50.

33. Cakmakci E. Isosorbide diallyl based antibacterial thiol–ene photocured coatings containing polymerizable fluoros quaternary phosphonium salt / E. Cakmakci, F. Sen, M. V. Kahraman // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2019. – V. 7. – №. 12. – C. 10605-10615.

34. Carneiro B. A. Targeting apoptosis in cancer therapy / B. A. Carneiro, W. S. El-Deiry // *Nature reviews Clinical oncology*. – 2020. – T. 17. – №. 7. – C. 395-417.

35. Carvalho T. M. The peculiarities of cancer cell metabolism: A route to metastasization and a target for therapy / T. M. A. Carvalho, H. J. Cardoso, M. I. Figueira, C. V. Vaz, S. Socorro // *European journal of medicinal chemistry*. – 2019. – V. 171. – C. 343-363.

36. CellROX® Oxidative Stress Reagents [Электронный ресурс]. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FCellROX_Oxidative_Stress_QR.pdf (дата обращения 15.08.2023)

37. Chan S. J. Antimicrobial Conjugated Oligoelectrolytes Containing Triphenylphosphonium Solubilizing Groups / S. J. Chan, K. Zhang, J. Y. Zhu, G. C. Bazan // *Chemistry*. – 2023. – V. 29. - №. 26. – C. e202203803.

38. Chang H. I. The synthesis, characterization and antibacterial activity of quaternized poly (2, 6-dimethyl-1, 4-phenylene oxide) s modified with ammonium and phosphonium salts / H. I. Chang, M. S. Yang, M. Liang // *Reactive and Functional Polymers*. – 2010. – V. 70. – №. 12. – C. 944-950.

39. Chang R. HeLa marker chromosomes, Chang liver cells, and liver-specific functions / R. Chang // *Science*. – V. 199. - №. 4328. – C. 567-568.

40. Chavarria D. Phytochemicals and quaternary phosphonium ionic liquids: Connecting the dots to develop a new class of antimicrobial agents / D. Chavarria, A. Borges, S. Benfeito, L. Sequeira, M. Ribeiro, C. Oliveira, F. Borges, M. Simões, F. Cagide // *Journal of Advanced Research*. – 2023. – V. 54. – C. 251-269.
41. Checa J. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes / J. Checa, J. M. Aran // *J Inflamm Res*. – 2020. – V. 2. - №. 13. – C. 1057-1073.
42. Chen Y. S. Biological and structural studies of phosphonium ‘masked thiolate’ compounds / Y. S. Chen, D. W. Allen, G. J. Tizzard, M. B. Pitak, S. J. Coles, N. A. Cross, N. Bricklebank // *European journal of medicinal chemistry*. – 2017. – V. 125. – P. 528-537.
43. Chevallet M. Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome / M. Chevallet, H. Diemer, A. Van Dorssealer, C. Villiers, T. Rabilloud // *Proteomics*. – 2007. – V. 7. – №. 11. – P. 1757-1770.
44. Choi S. Y. Dual functional ionic liquids as plasticisers and antimicrobial agents for medical polymers / S. Ying Choi, H. Rodríguez, A. Mirjafari, D. F. Gilpin, S. McGrath, K. R. Malcolm, M. M. Tunney, R. D. Rogerscf, T. McNally // *Green Chemistry*. – 2011. – V. 13. – №. 6. – C. 1527-1535.
45. Chopra I. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance / I. Chopra, M. Roberts // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2001. – V. 65. – №. 2. – C. 232-260
46. CLS Product Information: RPMI 1788 [Электронный ресурс]. URL: <https://sputnik-group.com/download/pdf/cls/rpmi-1788.pdf> (дата обращения 27.11.2025)
47. Dardonville C. SAR studies of diphenyl cationic trypanocides: Superior activity of phosphonium over ammonium salts / C. Dardonville, A. A. Alkhaldi, H. P. De Koning // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2015. – V. 6. – №. 2. – C. 151-155.

48. Demura M. Determination of membrane potential with lipophilic cations. Comparison of estimated values with various phosphonium ions / M. Demura, N. Kamo, Y. Kobatake // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1985. – V. 812. – №. 2. – C. 377-386.
49. Dhanya D. Phosphonium salt displays cytotoxic effects against human cancer cell lines / D. Dhanya, G. Palma, R. A. Cappello, A. Mariconda, S. M. Sinicropi, F. Giordano, V. V. Del, A. Ramunno, C. Arra, P. Longo, C. Saturnino // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. – 2017. – V. 17. – №. 13. – C. 1796-1804.
50. Ding W. Q. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol / W. Q. Ding, B. Liu, J. L. Vaught, H. Yamauchi, S. E. Lind // *Cancer Res*. – 2005. – V.65. – №8. – C. 3389-3395.
51. Edlich F. Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol / F. Edlich, S. Banerjee, M. Suzuki, M. M. Cleland, D. Arnoult, C. Wang, A. Neutzner, N. Tjandra, R. J. Youle // *Cell*. – 2011. – V. 145. – №. 1. – C. 104-116.
52. El-Newehy M. H. Biocidal polymers: Preparation and antimicrobial assessment of immobilized onium salts onto modified chitosan / M. H. El-Newehy, E. R. Kenawy, S. S. Al-Deyab // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2014. – V. 63. – №. 15. – P. 758-766.
53. Ermolaev V. V. Sterically hindered quaternary phosphonium salts (QPSs): Antimicrobial activity and hemolytic and cytotoxic properties / V. V. Ermolaev, D. M. Arkhipova, V. A. Miluykov, A. P. Lyubina, S. K. Amerhanova, N. V. Kulik, A. D. Voloshina, V. P. Ananikov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 23. – №. 1. – C. 86
54. Farha M. A. Drug repurposing for antimicrobial discovery / M. A. Farha, E. D. Brown // *Nature microbiology*. – 2019. – V. 4. – №. 4. – C. 565-577.
55. Filipovska A. Delivery of antisense peptide nucleic acids (PNAs) to the cytosol by disulphide conjugation to a lipophilic cation / A. Filipovska, M. R. Eccles, R. A. Smith, M. P. Murphy // *FEBS letters*. – 2004. – V. 556. – №. 1-3. – C. 180-186.

56. Finichiu P. G. Mitochondrial accumulation of a lipophilic cation conjugated to an ionisable group depends on membrane potential, pH gradient and pK_a: implications for the design of mitochondrial probes and therapies / P. G. Finichiu, A. M. James, L. Larsen, R. A. Smith, M. P. Murphy // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. – 2013. – V. 45. – №. 1. – C. 165-173.

57. Finley L. W. S. What is cancer metabolism? / L. W. S. Finley // *Cell*. – 2023. – V.186. - №.8. – C.1670-1688.

58. Fitzgerald K. A. TNF α / K. A. Fitzgerald, L. A. J. O'Neill, A. J. H. Gearing, R. E. Callard // *The Cytokine FactsBook and Webfacts (Second Edition)*. - Academic Press – 2001. – C. 474-480.

59. Flores A. Increased lactate dehydrogenase activity is dispensable in squamous carcinoma cells of origin / A. Flores, S. Sandoval-Gonzalez, R. Takahashi, A. Krall, L. Sathe, L. Wei, C. Radu, J. H. Joly, N. A. Graham, H. R. Christofk, W. E. Lowry // *Nature communications*. – 2019. – V. 10. – №. 1. – C. 91.

60. Gardner Z. S. Synthesis and biological evaluation of novel 2-alkoxycarbonylallylester phosphonium derivatives as potential anticancer agents / Z. S. Gardner, T. J. Schumacher, C. T. Ronayne, G. P. Kumpati, M. J. Williams, A. Yoshimura, H. Palle, C. Mani, J. Rumbley, V. R. Mereddy // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2021. – V. 45. – E. 128136.

61. Green D. R. Cell death signaling / D. R. Green, F. Llambi // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2015. – V. 7. – №. 12. – E. a006080.

62. Han M. Mitochondrial delivery of doxorubicin via triphenylphosphine modification for overcoming drug resistance in MDA-MB-435/DOX cells / M. Han, M. R. Vakili, H. Soleymani Abyaneh, O. Molavi, R. Lai, A. Lavasanifar // *Molecular pharmaceutics*. – 2014. – V. 11. – №. 8. – C. 2640-2649.

63. Hartmann M. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy / M. Hartmann, M. Berditsch, J. Hawecker, M. F. Ardakani, D. Gerthsen, A. S. Ulrich // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – №. 8. – C. 3132-3142.

64. Hegstad K. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? / K. Hegstad, S. Langsrud, B. T. Lunestad, A. A. Scheie, M. Sunde, S. P. Yazdankhah // *Microbial drug resistance*. – 2010. – V. 16. – №. 2. – C. 91-104.
65. Hoskin, D. W. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides / D. W. Hoskin, A. Ramamoorthy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. — 2008. — V.2. — № 1778. — C. 357-375.
66. Hutchings M. I. Antibiotics: past, present and future / M. I. Hutchings, A. W. Truman, B. Wilkinson // *Current opinion in microbiology*. – 2019. – V. 51. – C. 72-80.
67. Iksanova A. G. In-vitro antitumor activity of new quaternary phosphonium salts, derivatives of 3-hydroxypyridine / A. G. Iksanova, R. R. Gabbasova, T. V. Kupriyanova, A. A. Akhunzyanov, M. V. Pugachev, R. M. Vafiva, N. V. Shtyrlin, K. V. Balakin, Y. G. Shtyrlin // *Anti-cancer drugs*. – 2018. – V. 29. – №. 7. – P. 682-690.
68. Indrayanto G. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research / G. Indrayanto, G. S. Putra, F. Suhud // *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*. – 2021. – V. 46. – C. 273-307.
69. Ismail I. H. The γ -H2A. X: Is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? / I. H. Ismail, M. J. Hendzel // *Environmental and molecular mutagenesis*. – 2008. – V. 49. – №. 1. – C. 73-82.
70. Jenssen H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R.E. Hancock // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2006. – V.19. – C.491–511
71. Jha S. Chapter 6 - Myocardial Basis for Heart Failure: Role of Cell Death / S. Jha, R. N. Kitsis // *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease (Second Edition)*. – 2011. – C. 85-102.
72. Joseph R. Phosphonium pillar[5]arenes as a new class of efficient biofilm inhibitors: importance of charge cooperativity and the pillar platform / R. Joseph, D. Kaizerman, I. M. Herzog, M. Hadar, M. Feldman, M. Fridman, Y. Cohen // *Chemical Communications*. – 2016. – V. 52. – №. 70. – C. 10656-10659.

73. Kamo N. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state / N. Kamo, M. Muratsugu, R. Hongoh, Y. Kobatake // *The Journal of membrane biology*. – 1979. – V. 49. – №. 2. – C. 105-121.

74. Kanazawa A. A novel approach to mode of action of cationic biocides morphological effect on antibacterial activity / A. Kanazawa, T. Ikeda, T. Endo // *Journal of Applied Microbiology*. – 1995. – V. 78. – №. 1. – C. 55-60.

75. Kanazawa A. Multifunctional tetracoordinate phosphorus species with high self-organizing ability / A. Kanazawa, T. Ikeda // *Coordination chemistry reviews*. – 2000. – V. 198. – №. 1. – C. 117-131.

76. Kanazawa A. Polymeric phosphonium salts as a novel class of cationic biocides. X. Antibacterial activity of filters incorporating phosphonium biocides / A. Kanazawa, T. Ikeda, T. Endo // *Journal of applied polymer science*. – 1994. – V. 54. – №. 9. – C. 1305-1310.

77. Kanazawa A. Polymeric phosphonium salts as a novel class of cationic biocides. III. Immobilization of phosphonium salts by surface photografting and antibacterial activity of the surface-treated polymer films / A. Kanazawa, T. Ikeda, T. Endo // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 1993. – V. 31. – №. 6. – C. 1467-1472.

78. Kanazawa A. Polymeric phosphonium salts as a novel class of cationic biocides. VII. Synthesis and antibacterial activity of polymeric phosphonium salts and their model compounds containing long alkyl chains / A. Kanazawa, T. Ikeda, T. Endo // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1994. – V. 53. – №. 9. – C. 1237-1244.

79. Kanazawa A. Synthesis and antimicrobial activity of dimethyl- and trimethyl-substituted phosphonium salts with alkyl chains of various lengths / A. Kanazawa, T. Ikeda, T. Endo // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1994. – V. 38. – №. 5. – C. 945-952.

80. Kang S. Membrane-targeting triphenylphosphonium functionalized ciprofloxacin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / S. Kang, K. Sunwoo, Y. Jung, J. K. Hur, K. H. Park, J. S. Kim, D. Kim // *Antibiotics*. – 2020. – V. 9. – №. 11. – C. 758.
81. Kaniecki K. A change of view: homologous recombination at single-molecule resolution / K. Kaniecki, L. De Tullio, E. C. Greene // *Nature Reviews Genetics*. – 2018. – T. 19. – №. 4. – C. 191.
82. Karimian A. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage / A. Karimian, Y. Ahmadi, B. Yousefi // *DNA repair*. – 2016. – T. 42. – C. 63-71.
83. Katsipis G. In vitro and in silico evaluation of the serrapeptase effect on biofilm and amyloids of *Pseudomonas aeruginosa* / G. Katsipis, D. I. Avgoulas, G. D. Geromichalos, M. Petala, A. A. Pantazaki // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2023. – V. 107. – №. 23. – C. 7269-7285.
84. Kawai M. Mechanisms of action of acriflavine: electron microscopic study of cell wall changes induced in *Staphylococcus aureus* by acriflavine / M. Kawai, J. Yamagishi // *Microbiology and immunology*. – 2009. – V. 53. – №. 9. – C. 481-486.
85. Kayumov A. R. New Derivatives of Pyridoxine Exhibit High Antibacterial Activity against Biofilm-Embedded *Staphylococcus* Cells / A. R. Kayumov, A. A. Nureeva, E. Yu. Trizna, G. R. Gazizova, M. I. Bogachev, N. V. Shtyrlin, M. V. Pugachev, S. V. Sapozhnikov, Y. G. Shtyrlin // *BioMed research international*. – 2015. – V. 2015. – C. 1-10.
86. Kelso G. F. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties / G. F. Kelso, C. M. Porteous, C. V. Coulter, G. Hughes, W. K. Porteous, E. C. Ledgerwood, R. A. Smith, M. P. Murphy // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. – №. 7. – C. 4588-4596.

87. Khairalla B. Membrane Potentials Trigger Molecular-Scale Rearrangements in the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria / B. Khairalla, I. Brand // *Langmuir*. – 2021. – V. 38. – №. 1. – C. 446-457.
88. Kharwar R. A computational approach to identify natural putative inhibitors to combat monkeypox / R. Kharwar, M. Bhatt, K. Patel, S. Patel, N. Daxini // *Nanotechnology and In Silico Tools*. – Elsevier, 2024. – C. 285-308.
89. Khasiyatullina N. R. Synthesis and antimicrobial properties of novel phosphonium salts bearing 1, 4-dihydroxyaryl fragment / N. R. Khasiyatullina, V. F. Mironov, A. D. Voloshina, A. S. Sapunova // *Chemistry & Biodiversity*. – 2019. – V. 16. – №. 5. – E. e1900039.
90. Kim D. Y. Radiolabeled phosphonium salts as mitochondrial voltage sensors for positron emission tomography myocardial imaging agents / D. Y. Kim, J. J. Min // *Nuclear medicine and molecular imaging*. – 2016. – V. 50. – №. 3. – C. 185-195.
91. Kim Y. J. Anti-biofilm activity of cell-free supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* against *Staphylococcus aureus* / Y. J. Kim, H. H. Yu, Y. J. Park, N. K. Lee, H. D. Paik // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – V. 30. – №. 12. – E. 1854.
92. Kim Y. Membrane damage of bacteria by silanols treatment / Y. Kim, S. Farrah, R. H. Baney // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2007. – V. 10. – №. 2. – C. 252-259.
93. Kodjo A. C. D. Synthesized Phosphonium Compounds Demonstrate Resistant Modulatory and Antibiofilm Formation Activities against Some Pathogenic Bacteria / C. D. K. Amengor, C. A. Danquah, E. B. A. Adusei, F. K. Kekessie, F. Ofosu-Koranteng, P. Pephrah, B. K. Harley, E. Orman, J. Adu, Y. Saaka // *Heteroatom Chemistry*. – 2022. – V. 2022. – C. 1-9.
94. Kohanski M. A. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks / M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, J. J. Collins // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – V. 8. – №. 6. – C. 423-435.

95. Kumar V. Study on the potential anti-cancer activity of phosphonium and ammonium-based ionic liquids / V. Kumar, S. V. Malhotra // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2009. – V. 19. – №. 16. – P. 4643-4646.
96. Kumari S. Antibacterial activity of new structural class of semisynthetic molecule, triphenyl-phosphonium conjugated diarylheptanoid / S. Kumari, S. Jayakumar, G. D. Gupta, S. C. Bihani, D. Sharma, V. K. Kutala, S. K. Sandur, V. Kumar // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2019. – V. 143. – C. 140-145.
97. Kumer A. The simulating study of HOMO, LUMO, thermo physical and quantitative structure of activity relationship (QSAR) of some anticancer active ionic liquids / A. Kumer, M. N. Sarker, P. Sunanda // *Eurasian Journal of Environmental Research*. – 2019. – V. 3. – №. 1. – C. 1-10.
98. Kurasaki H. LpxC inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation of oxazolidinones as Gram-negative antibacterial agents / H. Kurasaki, K. Tsuda, M. Shinoyama, N. Takaya, Y. Yamaguchi, R. Kishii, K. Iwase, N. Ando, M. Nomura, Y. Kohno // *ACS medicinal chemistry letters*. – 2016. – V. 7. – №. 6. – C. 623-628.
99. Lavappa K. S. Examination of ATCC stocks for HeLa marker chromosomes in human cell lines / K. S. Lavappa, M. L. Macy, J. E. Shannon // *Nature*. – 1976. V. 259. - №. 5540. – C. 211-213.
100. Lei Q. PEGylated bis-quaternary triphenyl-phosphonium tosylate allows for balanced antibacterial activity and cytotoxicity / Q. Lei, X. Lai, Y. Zhang, Z. Li, R. Li, W. Zhang, N. Ao, H. Zhang // *ACS Applied Bio Materials*. – 2020. – V. 3. – №. 9. – C. 6400-6407.
101. Leung C. W. A Photostable AIE Luminogen for Specific Mitochondrial Imaging and Tracking / C. W. Leung, Y. Hong, S. Chen, E. Zhao, J. W. Lam, B. Z. Tang // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – V. 135. – №. 1. – C. 62-65.
102. Li C. Preparation and antimicrobial activity of quaternary phosphonium modified epoxidized natural rubber / C. Li, Y. Liu, Q. Y. Zeng, N. J. Ao // *Materials Letters*. – 2013. – V. 93. – C. 145-148.

103. Li J. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections / J. Li, R. L. Nation, J. D. Turnidge, R. W. Milne, K. Coulthard, C. R. Rayner, D. L. Paterson // *The Lancet infectious diseases*. – 2006. – V. 6. – №. 9. – C. 589-601
104. Li J. Synergetic effects of ultrasound and slightly acidic electrolyzed water against *Staphylococcus aureus* evaluated by flow cytometry and electron microscopy / J. Li, T. Ding, X. Liao, S. Chen, X. Ye, D. Liu // *Ultrasonics sonochemistry*. – 2017. – V. 38. – C. 711-719.
105. Li M. Indolylalkyltriphenylphosphonium Analogues Are Membrane-Depolarizing Mycobactericidal Agents / M. Li, S. A. Nyantakyi, P. Gopal, D. B. Aziz, T. Dick, M. L. Go // *ACS medicinal chemistry letters*. – 2017. – V. 8. – №. 11. – C. 1165-1170.
106. Li Y. Synthesis and discovery of mitochondria-targeting oleanolic acid derivatives for potential PI3K inhibition / Y. Li, Q. Zeng, R. Wang, B. Wang, R. Chen, N. Wang, Y. Lu, F. Shi, W. Dehaen, Q. Huai // *Fitoterapia*. – 2022. – V. 162. – C. 105291.
107. Liberman E. A. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria / E. A. Liberman, V. P. Topaly, L. M. Tsofina, A. A. Jasaitis, V. P. Skulachev // *Nature*. – 1969. – V. 222. – №. 5198. – C. 1076-1078.
108. Lin S. Semisynthetic flavone-derived antimicrobials with therapeutic potential against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / S. Lin, J. Koh, T.T. Aung, W. Ling, W. Sin, F. Lim, L. Wang, R. Lakshminarayanan, L. Zhou, D.T.H. Tan, D. Cao, R.W. Beuerman, L. Ren, S. Liu // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 60. – №. 14. – C. 6152-6165.
109. Liu H. Delivery of mitochondriotropic doxorubicin derivatives using self-assembling hyaluronic acid nanocarriers in doxorubicin-resistant breast cancer / H. Liu, N. Guo, W. Guo, M. Huang-Fu, M. R. Vakili, J. Chen, W. Xu, Q. Wei, M. Han, A. Lavasanifar, J. Gao // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2018. – V. 39. – №. 10. – C. 1681-1692.

110. Lo C. J. Nonequivalence of membrane voltage and ion-gradient as driving forces for the bacterial flagellar motor at low load / C. J. Lo, M. C. Leake, T. Pilizota, R. M. Berry // *Biophysical journal*. – 2007. – V. 93. – №. 1. – C. 294-302.
111. Lucchini J. J. Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols / J. J. Lucchini, J. Corre, A. Cremieux // *Research in Microbiology*. – 1990. – V. 141. – №. 4. – C. 499-510.
112. Ludueñ M. A., Expression of liver and placental alkaline phosphatases in Chang liver cells / M. A. Ludueñ, G. M. Iverson, H. H. Sussman // *Journal of Cellular Physiology*. – 1977. V. 91. - №. 1. – C. 119-129.
113. Luque-Ortega J. R. New Benzophenone-Derived Bisphosphonium Salts as Leishmanicidal Leads Targeting Mitochondria through Inhibition of Respiratory Complex II / J. R. Luque-Ortega, J. R. Reuther, P. Rivas, C. Dardonville // *Journal of medicinal chemistry*. – 2010. – V. 53. – №. 4. – C. 1788-1798.
114. Ma M. Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition / M. Ma, A. Rodriguez, K. Sugimoto // *Current genetics*. – 2020. – V. 66. – №. 2. – C. 327-333.
115. Ma S. Computational study of the effects of cations and anions to the cytotoxicity of diverse ionic liquids by supervised machine learning / S. Ma, M. Lv, X. Zhang, H. Zhai, W. Lv // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. – 2015. – V. 144. – C. 138-147.
116. Madar I. Characterization of membrane potential-dependent uptake of the novel PET tracer ¹⁸F-fluorobenzyl triphenylphosphonium cation / I. Madar, H. Ravert, B. Nelkin, M. Abro, M. Pomper, R. Dannals, J. J. Frost // *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. – 2007. – V. 34. – №. 12. – C. 2057-2065.
117. Mahlapuu M. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents / M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, C. Björn // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2016. – V. 6. – C. 194

118. Mamedov V. A. Synthesis of Morpholine-, Piperidine-, and N-Substituted Piperazine-Coupled 2-(Benzimidazol-2-yl)-3-arylquinoxalines as Novel Potent Antitumor Agents / V. A. Mamedov, N. A. Zhukova, A. D. Voloshina, V. V. Syakaev, T. N. Beschastnova, A. P. Lyubina, S. K. Amerhanova, A. I. Samigullina, A. T. Gubaidullin, D. N. Buzyurova, I. Kh. Rizvanov, O. G. Sinyashin // *ACS Pharmacology & Translational Science*. – 2022. – T. 5. – №. 10. – C. 945-962.

119. Manetta A. Novel Phosphonium Salts Displaying *Vitro* and *In Vivo* Cytotoxic Activity against Human Ovarian Cancer Cell Lines / A. Manetta, G. Gamboa, A. Nasser, Y. D. Podnos, D. Emma, G. Dorion, L. Rawlings, P. M. Carpenter, A. Bustamante, J. Patel, D. Rideout // *Gynecologic oncology*. – 1996. – T. 60. – №. 2. – C. 203-212.

120. Manic G. Trial watch: targeting ATM–CHK2 and ATR–CHK1 pathways for anticancer therapy / G. Manic, F. Obrist, A. Sistigu, I. Vitale // *Molecular & cellular oncology*. – 2015. – V. 2. – №. 4. – E. e1012976.

121. Mansour S. T. The synthesis and antineoplastic activities of thiaziridine, sulfidomethylphosphonium, and dithiaphosphitane-sulfide against the Ehrlich ascites carcinoma / S. T. Mansour, A. I. Hashem, M. A. Abd-El-Maksoud, M. El-Hussieny, A. I. El-Makawy, S. H. Abdel-Aziem, F. M. Soliman // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 2022. – V. 36. – №. 3. – C. 536-552.

122. Metelytsia L. O. Theoretical and experimental studies of phosphonium ionic liquids as potential antibacterials of MDR *Acinetobacter baumannii* / L. O. Metelytsia, D. M. Hodyna, I. V. Semenyuta, V. V. Kovalishyn, S. P. Rogalsky, K. Yu. Derevianko, V. S. Brovarets, I. V. Tetko // *Antibiotics*. – 2022. – V. 11. – №. 4. – C. 491.

123. Michaud M. E. Quaternary Phosphonium Compound Unveiled as a Potent Disinfectant against Highly Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates / M. E. Michaud, R. A. Allen, K. R. Morrison-Lewis, C. A. Sanchez, K. P. Minbiole, S. J. Post, W. M. Wuest // *ACS Infectious Diseases*. – 2022. – V. 8. – №. 11. – C. 2307-2314.

124. Millard M. Preclinical evaluation of novel triphenylphosphonium salts with broad-spectrum activity / M. Millard, D. Pathania, Y. Shabaik, L. Taheri, J. Deng, N. Neamati // PloS one. – 2010. – V. 5. – №. 10. – E. e13131.

125. Modica-Napolitano J. S. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells / J. S. Modica-Napolitano, J. R. Aprile // Advanced drug delivery reviews. – 2001. – V. 49. – №. 1-2. – C. 63-70.

126. Moreno-Sánchez R. Energy metabolism in tumor cells / R. Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, E. Saavedra // The FEBS journal. – 2007. – V. 274. – №. 6. – C. 1393-1418

127. Moura Junior C. F. Synthesis and characterization of n-phosphonium chitosan and its virucidal activity evaluation against coronavirus / C. F. de Moura Junior, D. Ochi, E. D. Freitas, J. Kerwald, M. A. d'Ávila, M. M. Beppu // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – V. 246. – C. 125665.

128. MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation [Электронный ресурс]. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt> (дата обращения 14.12.2023)

129. Mukherjee I. Shear-and temperature-dependent viscosity behavior of two phosphonium-based ionic liquids and surfactant Triton X-100 and their biocidal activities / I. Mukherjee, K. Manna, G. Dinda, S. Ghosh, S. P. Moulik // Journal of Chemical & Engineering Data. – 2012. – V. 57. – №. 5. – C. 1376-1386.

130. Mulani M. S. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review / M. S. Mulani, E. E. Kamble, S. N. Kumkar, M. S. Tawre, K. R. Pardesi // Frontiers in microbiology. – 2019. – V. 10. – E. 539

131. Nagao A. HIF-1-dependent reprogramming of glucose metabolic pathway of cancer cells and its therapeutic significance / A. Nagao, M. Kobayashi, S. Koyasu, C. C. Chow, H. Harada // International journal of molecular sciences. – 2019. – V. 20. – №. 2. – C. 238.

132. Nahlé A. H. Quaternary aryl phosphonium salts as corrosion inhibitors for iron in HCl / A. H. Nahlé, T. J. Harvey, F. C. Walsh // *Journal of Alloys and Compounds*. – 2018. – V. 765. – C. 812-825.

133. Nazarov P. A. Fluorescein Derivatives as Antibacterial Agents Acting via Membrane Depolarization / P.A. Nazarov, R.S. Kirsanov, S.S. Denisov, L.S. Khailova, M.V. Karakozova, K.G. Lyamzaev, G.A. Korshunova, K.A. Lukyanov, E.A. Kotova, Y.N. Antonenko // *Biomolecules*. – 2020. – V. 10. – №. 2. – C. 309.

134. Nazarov P.A. Penetration of Triphenylphosphonium Derivatives through the Cell Envelope of Bacteria of Mycobacteriales Order / P.A. Nazarov, K.B. Majorov, A.S. Apt, M.V. Skulachev // *Pharmaceuticals*. – 2023. – V. 16. – №. 5. – C. 688.

135. Nikitina E. V. Antibacterial effects of quaternary bis-phosphonium and ammonium salts of pyridoxine on *Staphylococcus aureus* cells: A single base hitting two distinct targets? / E. V. Nikitina, M. I. Zeldi, M. V. Pugachev, S. V. Sapozhnikov, N. V. Shtyrlin, S. V. Kuznetsova, V. E. Evtygin, M. I. Bogachev, A. R. Kayumov, Y. G. Shtyrlin // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – V. 32. – C. 1-7.

136. Nikitina E. V. Elucidation of the mode of action of new antibacterial bis-phosphonium salts of pyridine derivatives active against *Staphylococcus aureus* / E. V. Nikitina, M. I. Zeldi, R. M. Vafina, M. V. Pugachev, N. V. Shtyrlin, S. V. Kuznetsova, Y. G. Shtyrlin // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2017. – V. 8. – №. 3. – C. 1906-1915.

137. Nishino T. An electron microscopic study of antagonism between cephalixin and erythromycin in *Staphylococcus aureus* / T. Nishino // *Japanese journal of microbiology*. – 1975. – V. 19. – №. 1. – C. 53-63.

138. Nissim M. Synthesis and Characterization of Durable Antibiofilm and Antiviral Silane-Phosphonium Thin Coatings for Medical and Agricultural Applications / M. Nissim, T. Iline-Vul, S. Shoshani, G. Jacobi, E. Malka, A. Dombrovsky, E. Banin, S. Margel // *ACS omega*. – 2023. – V. 8. – №. 42. – C. 39354-39365.

139. Noroozi-Shad N. Quaternary phosphonium salts in the synthetic chemistry: Recent progress, development, and future perspectives / N. Noroozi-Shad, M. Gholizadeh, H. Sabet-Sarvestani // *Journal of Molecular Structure*. – 2022. – V. 1257. – E. 132628.

140. Nössing C. 50 years on and still very much alive: ‘Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics’ / C. Nössing, K.M. Ryan // *Br J Cancer*. - 2023. – V. 128. – C. 426-431.

141. Nunnari J. Mitochondria: in sickness and in health / J. Nunnari, A. Suomalainen // *Cell*. – 2012. – V. 148. – №. 6. – C. 1145-1159

142. O’Toole G. A. Diphosphonium ionic liquids as broad spectrum antimicrobial agents / G. A. O’Toole, M. Wathier, M. E. Zegans, R. M. Shanks, R. Kowalski, M. W. Grinstaff // *Cornea*. – 2012. – V. 31. – №. 7. – C. 810.

143. Oyewole A. O. Mitochondria-targeted antioxidants / A. O. Oyewole, M. A. Birch-Machin // *The FASEB Journal*. – 2015. – V. 29. – №. 12. – C. 4766-4771.

144. Park J. H. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets / J. H. Park, W. Y. Pyun, H. W. Park // *Cells*. – 2020. – V. 9. – №. 10. – C. 2308

145. Patil M. Synthesis and antimicrobial testing of 5-fluorouracil derivatives / M. Patil, K. Serhii, F. Garzino, Q. Gobert, S. Giorgio, J. Raimundo, J. Bolla, M. Camplo // *Archiv der Pharmazie*. – 2023. – V. 356. - №. 7. – E. e2300103.

146. Pavlova J.A. Triphenylphosphonium Analogs of Chloramphenicol as Dual-Acting Antimicrobial and Antiproliferating Agents / J.A. Pavlova, Z.Z. Khairullina, A.G. Tereshchenkov, P.A. Nazarov, D.A. Lukianov, I.A. Volynkina, D.A. Skvortsov, G.I. Makarov, E. Abad, S.Y. Murayama // *Antibiotics*. – 2021. – T. 10. – №. 5. – C. 489.

147. Persson Ö. Metabolic control of the Escherichia coli universal stress protein response through fructose-6-phosphate / Ö. Persson, Å. Valadi, T. Nyström, A. Farewell // *Molecular microbiology*. – 2007. – T. 65. – №. 4. – C. 968-978.

148. Petkovic M. Unravelling the mechanism of toxicity of alkyltributylphosphonium chlorides in *Aspergillus nidulans* conidia / M. Petkovic, D. O. Hartmann, G. Adamová, K. R. Seddon, L. P. N. Rebelo, C. S. Pereira // *New Journal of Chemistry*. – 2012. – V. 36. – №. 1. – C. 56-63.

149. Peyraga G. Radiothérapie et toxicité médullaire : actualités et perspectives / G. Peyraga, A. Ducassou, F. X. Arnaud, T. Lizée, J. Pouédras, É. Moyal // *Cancer/Radiothérapie*. – 2021. – V. 25. – №. 1. – C. 55-61.

150. Procházková D. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids / D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová // *Fitoterapia*. – 2011. – V. 82. – №. 4. – C. 513-523.

151. Pugachev M. V. Synthesis and antibacterial activity of novel phosphonium salts on the basis of pyridoxine / M. V. Pugachev, N. V. Shtyrlin, L. P. Sysoeva, E. V. Nikitina, T. I. Abdullin, A. G. Iksanova, A. A. Ilaeva, R. Z. Musin, E. A. Berdnikov, Y. G. Shtyrlin // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2013. – V. 21. – №. 14. – C. 4388-4395.

152. Rabin N. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents / N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, H. O. Sintim // *Future medicinal chemistry*. – 2015. – V. 7. – №. 4. – C. 493-512

153. Raetz C. R. H. Lipopolysaccharide endotoxins / C. R. H. Raetz, C. Whitfield // *Annual review of biochemistry*. – 2002. – V. 71. – C. 635.

154. Raynaud C. Active benzimidazole derivatives targeting the MmpL3 transporter in *Mycobacterium abscessus* / C. Raynaud, W. Daher, M. D. Johansen, F. Roquet-Banères, M. Blaise, O. K. Onajole, A. P. Kozikowski, J-L. Herrmann, J. Dziadek, K. Gobis, L. Kremer // *ACS infectious diseases*. – 2019. – V. 6. – №. 2. – C. 324-337

155. Reczek C. R. The two faces of reactive oxygen species in cancer / C. R. Reczek, N. S. Chandel // *Annual review of cancer biology*. – 2017. – V. 1. – C. 79-

156. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // *J Cell Biol.* – 1963. – V. 17. – P. 208–213.
157. Rideout D. Mechanism of inhibition of FaDu hypopharyngeal carcinoma cell growth by tetraphenylphosphonium chloride / D. Rideout, A. Bustamante, J. Patel // *International journal of cancer.* – 1994. – V. 57. – №. 2. – C. 247-253.
158. Rokitskaya T. I. Lipophilic ion aromaticity is not important for permeability across lipid membranes / T. I. Rokitskaya, E. A. Kotova, V. B. Luzhkov, R. S. Kirsanov, E. V. Aleksandrova, G. A. Korshunova, V. N. Tashlitsky, Y. N. Antonenko // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* – 2021. – V. 1863. – №. 1. – E. 183483.
159. Ross M. F. Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells / M. F. Ross, Da Ros T, F. H. Blaikie, T. A. Prime, C. M. Porteous, I. I. Severina, V. P. Skulachev, H. G. Kjaergaard, R. A. Smith, M. P. Murphy // *Biochem J.* – 2006. – V.400. - №1. – C. 199-208.
160. Ross M. F. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology / M. F. Ross, G. F. Kelso, F. H. Blaikie, A. M. James, H. M. Cochemé, A. Filipovska, T. Da Ros, T. R. Hurd, R. A. J. Smith, M. P. Murphy // *Biochemistry (Moscow).* – 2005. – V. 70. – №. 2. – C. 222-230.
161. Ross M. F. Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells / M. F. Ross; T. A. Prime; I. Abakumova; A. M. James; C. M. Porteous; R. A. J. Smith; M. P. Murphy // *Biochemical Journal.* – 2008. – V. 411. – №. 3. – C. 633-645
162. Rousselle B. Development of a novel highly anti-proliferative family of gold complexes: Au (i)-phosphonium-phosphines / B. Rousselle, F. Bouyer, J. Bayardon, M. Laly, F. Ghiringhelli, Y. Rousselin, E. Bodio, R. Malacea-Kabbara // *Dalton Transactions.* – 2021. – V. 50. – №. 14. – C. 4880-4889.

163. Sabharwal S. S. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? / S. S. Sabharwal, P. T. Schumacker // *Nature Reviews Cancer*. – 2014. – V. 14. – №. 11. – C. 709-721.

164. Šarić A. Non-toxic fluorescent phosphonium probes to detect mitochondrial potential / A. Šarić, I. Crnolatac, F. Bouillaud, S. Sobočanec, A-M. Mikecin, Ž. M. Šafranko, T. Delgeorgiev, I. Piantanida, T. Balog, P. Petit // *Methods and applications in fluorescence*. – 2017. – V. 5. – №. 1. – E. 015007.

165. Schrader S. M. Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it / S. M. Schrader, J. Vaubourgeix, C. Nathan // *Science translational medicine*. – 2020. – V. 12. – №. 549. – E. eaaz6992.

166. Shi X. Amphiphilic copolymer and TPGS mixed magnetic hybrid micelles for stepwise targeted co-delivery of DOX/TPP–DOX and image-guided chemotherapy with enhanced antitumor activity in liver cancer / X. Shi, G. Lv, X. Sun, D. Cao, G. Wang, Y. Chang // *RSC advances*. – 2017. – V. 7. – №. 41. – C. 25694-25701.

167. Shtyrlin N. V. Synthesis and biological activity of quaternary phosphonium salts based on 3-hydroxypyridine and 4-deoxypyridoxine / N. V. Shtyrlin, R. M. Vafina, M. V. Pugachev, R. M. Khaziev, E. V. Nikitina, M. I. Zeldi, A. G. Iksanova, and Yu. G. Shtyrlin // *Russian Chemical Bulletin*. – 2016. – V. 65. – C. 537-545.

168. Sianglum W. Proteome analyses of cellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomyrone, a novel antibiotic candidate / W. Sianglum, P. Srimanote, W. Wonglumsom, K. Kittiniyom, S. P. Voravuthikunchai // *Plos one*. – 2011. – V. 6. – №. 2. – E. e16628.

169. Sikder M. M. Reactive Oxygen Species: Role in Pathophysiology, and Mechanism of Endogenous and Dietary Antioxidants during Oxidative Stress / M. M. Sikder, X. Li, S. Akumwami, S.A. Labony. // *Chonnam Med J*. - 2025. – V. 61. - №. 1. – C. 32-45.

170. Simões M. Biofilm control by ionic liquids / M. Simões, A. R. Pereira, L. C. Simões, F. Cagide, F. Borges // *Drug Discovery Today*. – 2021. – V. 26. – №. 6. – C. 1340-1346
171. Sivapragasam M. Microbial biocompatibility of phosphonium-and ammonium-based ionic liquids / M. Sivapragasam, J. R. Jaganathan, J. M Levêque, M. Moniruzzaman, M. A. Mutalib // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – V. 273. – C. 107-115.
172. Skulachev V. P. Mitochondrion-targeted antioxidant SkQ1 prevents rapid animal death caused by highly diverse shocks / V. P. Skulachev, M. Yu. Vyssokikh, B. V. Chernyak, O. A. Averina, A. A. Andreev-Andrievskiy, R. A. Zinovkin, K. G. Lyamzaev, M. V. Marey, M. V. Egorov, O. J. Frolova, D. B. Zorov, M. V. Skulachev, V. A. Sadovnichii // *Scientific Reports*. – 2023. – V. 13. – №. 1. – C. 4326.
173. Smith J. The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer / J. Smith, L. M. Tho, N. Xu, D. A. Gillespie // *Advances in cancer research*. – 2010. – V. 108. – C. 73-112.
174. Smith T. C. The effect of the fluorescent probe, 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, on the energy metabolism of Ehrlich ascites tumor cells / T.C. Smith, J.T. Herlihy, S.C. Robinson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1981. – V. 256. – №. 3. – C. 1108-1110.
175. Solomon M. A. In vitro assessment of the utility of stearyl triphenyl phosphonium modified liposomes in overcoming the resistance of ovarian carcinoma Ovar-3 cells to paclitaxel / M. A. Solomon, A. A. Shah, G. G. M. D'Souza // *Mitochondrion*. – 2013. – V. 13. – №. 5. – C. 464-472.
176. Sommers K. J. Quaternary Phosphonium Compounds: An Examination of Non-Nitrogenous Cationic Amphiphiles That Evade Disinfectant Resistance / K. J. Sommers, M. E. Michaud, C. E. Hogue, A. M. Scharnow, L. E. Amoo, A. A. Petersen, R. G. Carden, K. P. C. Minbiole, W. M. Wuest // *ACS Infectious Diseases*. – 2022. – V. 8. – №. 2. – C. 387-397.

177. Song M. Y. Role of reactive oxygen species and redox in regulating the function of transient receptor potential channels / M. Y. Song, A. Makino, J. X. Yuan // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 15. - №. 6. – C. 1549-1565.

178. Sritharan S. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin / S. Sritharan, N. Sivalingam // *Life sciences.* – 2021. – V. 278. – E. 119527.

179. Stephens L. Antimicrobial innovation: a current update and perspective on the antibiotic drug development pipeline / L. J. Stephens, M. V. Werrett, A. C. Sedgwick, S. D. Bull, P. C. Andrews // *Future Medicinal Chemistry.* – 2020. – T. 12. – №. 22. – C. 2035-2065

180. Strobykina I. Y. Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity of triphenylphosphonium (TPP) conjugates of 1, 2, 3-triazolyl nucleoside analogues / I. Yu. Strobykina, A. D. Voloshina, O. V. Andreeva, A. S. Sapunova, A. P. Lyubina, S. K. Amerhanova, M. G. Belenok, L. F. Saifina, V. E. Semenov, V. E. Kataev // *Bioorganic chemistry.* – 2021. – V. 116. – E. 105328.

181. Szweda P. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus* / P. Szweda, M. Schielmann, R. Kotlowski, G. Gorczyca, M. Zalewska, S. Milewski // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2012. – T. 96. – №. 5. – C. 1157-1174.

182. Tatarinov D.A. Synthesis of 2-(2- hydroxyaryl) alkenylphosphonium salts from phosphine oxides via ring- closing ring-opening approach and their antimicrobial evaluation / D.A. Tatarinov, D.M. Kuznetsov, A.D. Voloshina, A.P. Lyubina, A.S. Strobykina, F.K. Mukhitova, F.M. Polyancev, V.F. Mironov // *Tetrahedron.* -2016. -V. 72. – P. 8493–8501

183. Tca P. N. triphenyl phosphonium-based substances are alternatives to common antibiotics / P. Tca, A. Banerjee, N. Pa // *Bulletin of Russian State Medical University.* – 2018. – T. 1.

184. Te Winkel J. D. Analysis of Antimicrobial-Triggered Membrane Depolarization Using Voltage Sensitive Dyes. *Front Cell* / J. D. Te Winkel, D. A.

Gray, K. H. Seistrup, L. W. Hamoen, H. Strahl // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2016. – V.13. - №. 4. – C. 29.

185. Terekhova N. V. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship of 2-(2-hydroxyaryl) alkenylphosphonium salts with potency as anti-MRSA agents / N. V. Terekhova, A. P. Lyubina, A. D. Voloshina, A. S. Sapunova, K. R. Khayarov, D. R. Islamov, K. S. Usachev, V. G. Evtugyn, D. A. Tatarinov, V. F. Mironov // *Bioorganic Chemistry*. – 2022. – V. 127. – E. 106030.

186. Terekhova N. V. Trialkyl (vinyl) phosphonium chlorophenol derivatives as potent mitochondrial uncouplers and antibacterial agents / N. V. Terekhova, L. S. Khailova, T. I. Rokitskaya, P. A. Nazarov, D. R. Islamov, K. S. Usachev, D. A. Tatarinov, V. F. Mironov, E. A. Kotova, Y. N. Antonenko // *ACS omega*. – 2021. – V. 6. – №. 31. – C. 20676-20685.

187. Terreni M. New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: latest research developments and future perspectives / M. Terreni, M. Taccani, M. Pregnolato // *Molecules*. – 2021. – V. 26. – №. 9. – C. 2671.

188. Theuretzbacher U. The global preclinical antibacterial pipeline / U. Theuretzbacher, K. Outterson, A. Engel, A. Karlén // *Nature Reviews Microbiology*. – 2020. – V. 18. – №. 5. – C. 275-285.

189. Tramer F. Screening of fullerene toxicity by hemolysis assay / F. Tramer, T. Da Ros, S. Passamonti // *Methods in molecular biology*. - 2012. - Totowa, NJ. : Humana Press. - 2012. - №.926 (926). - P. 203-217.

190. Trnka J. Lipophilic triphenylphosphonium cations inhibit mitochondrial electron transport chain and induce mitochondrial proton leak / J. Trnka, M. Elkalaf, M. Anděl // *PloS one*. – 2015. – V. 10. – №. 4. – E. e0121837.

191. Tsepaeva O. V. Synthesis and in vitro evaluation of triphenylphosphonium derivatives of acetylsalicylic and salicylic acids: Structure-dependent interactions with cancer cells, bacteria, and mitochondria / O. V. Tsepaeva, T. I. Salikhova, L. R. Grigor'eva, D. V. Ponomaryov, T. Dang, R. A. Ishkaeva, T. I. Abdullin, A. V. Nemtarev, V. F. Mironov // *Medicinal Chemistry Research*. – 2021. – V. 30. – C. 925-939.

192. Tyagi P. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane / P. Tyagi, M. Singh, H. Kumari, A. Kumari, K. Mukhopadhyay // *PloS one*. – 2015. – V. 10. – №. 3. – E. e0121313.
193. Vancomycin [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459263/> (дата обращения 04.08.2023)
194. Voloshina A. D. Antimicrobial and cytotoxic effects of ammonium derivatives of diterpenoids steviol and isosteviol / A.D. Voloshina, A.S. Sapunova, N.V. Kulik, M.G. Belenok, I.Y. Strobrykina, A. P. Lyubina, S.K. Gumerova, V.E. Kataev // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2021. – V. 32. – E. 115974.
195. Wang J. MitoQ protects ovarian organoids against oxidative stress during oogenesis and folliculogenesis in vitro / J. Wang, H. Du, L. Ma, M. Feng, L. Li, X. Zhao, Y. Dai // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24. – №. 2. – C. 924.
196. Wang S. Targeting the MDM2–p53 protein–protein interaction for new cancer therapy: progress and challenges / S. Wang, Y. Zhao, A. Aguilar, D. Bernard, C. Y. Yang // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2017. – V. 7. – №. 5. – E. a026245.
197. Warburg O. The metabolism of tumors in the body / O. Warburg, F. Wind, E. Negelein // *The Journal of general physiology*. – 1927. – V. 8. – №. 6. – C. 519.
198. Wayne P. A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Barry A. L. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline / Wayne P. A. // *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. – 1999. – V. 19. – №. 18.
199. Weerapreeyakul N. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line / N. Weerapreeyakul, A. Nonpunya, S. Barusrux, T. Thitimetharoch, B. Sripanidkulchai // *Chinese medicine*. – 2012. – V. 7. – №. 1. – C. 1-7.

200. Weinstein M. P. CLSI M07. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically / M. P. Weinstein // CLSI standard M07. – 2018. – V. 11. – С. 1-13.
201. Williams A. B. p53 in the DNA-damage-repair process / A. B. Williams, B. Schumacher // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2016. – V. 6. – №. 5.
202. World Health Organization Cancer Topics. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/>(дата обращения 05.03.2023)
203. World Health Organization Cancer. 2022 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (дата обращения 05.03.2023)
204. Wylie M. P. Phosphonium ionic liquid-infused poly (vinyl chloride) surfaces possessing potent antifouling properties / M. P. Wylie, S. E. Bell, P. Nockemann, R. Bell, C. P. McCoy // ACS omega. – 2020. – V. 5. – №. 14. – С. 7771-7781.
205. Xi L. Dual-Targeting Polymeric Nanocarriers to Deliver ROS-Responsive Prodrugs and Combat Multidrug Resistance of Cancer Cells / L. Xi, J. Wang, Y. Wang, Z. Ge // Macromolecular Bioscience. – 2021. – V. 21. – №. 9. – С. 2100091.
206. Xia J. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance / J. Xia, J. Gao, W. Tang // Bioscience trends. – 2016. – V. 10. – №. 1. – С. 14-21.
207. Xie A. G. Long-acting antibacterial activity of quaternary phosphonium salts functionalized few-layered graphite / A. G. Xie, X. Cai, M. S. Lin, T. Wu, X. J. Zhang, Z. D. Lin, S. Tan // Materials Science and Engineering: B. – 2011. – V. 176. – №. 15. – С. 1222-1226.
208. Xie M. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification / M. Xie, D. Liu, Y. Yang // Open biology. – 2020. – V. 10. – №. 7. – С. 200004.

209. Xie W. Evaluation of DNA-targeted anti-cancer drugs by Raman spectroscopy / W. Xie, Y. Ye, A. Shen, L. Zhou, Z. Lou, X. Wang, J. Hu // *Vibrational spectroscopy*. – 2008. – V. 47. – №. 2. – C. 119-123.
210. Xu Y. Antimicrobial activity of punicalagin against *Staphylococcus aureus* and its effect on biofilm formation / Y. Xu, C. Shi, Q. Wu, Z. Zheng, P. Liu, G. Li, X. Peng, X. Xia // *Foodborne pathogens and disease*. – 2017. – T. 14. – №. 5. – C. 282-287.
211. Xue Y. Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts / Y. Xue, H. Xiao, Y. Zhang // *International journal of molecular sciences*. – 2015. – V. 16. – №. 2. – P. 3626-3655.
212. Xue Y. Characterization and antipathogenic evaluation of a novel quaternary phosphonium tripolyacrylamide and elucidation of the inactivation mechanisms / Y. Xue, H. Xiao // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2016. – V. 104. – №. 3. – P. 747-757.
213. Xue Y. Novel quaternary phosphonium-type cationic polyacrylamide and elucidation of dual-functional antibacterial/antiviral activity / Y. Xue, Y. Pan, H. Xiao, Y. Zhao // *RSC Advances*. – 2014. – V. 4. – №. 87. – C. 46887-46895.
214. Yang E. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death / E. Yang, J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson, S. J. Korsmeyer // *Cell*. – 1995. – V. 80. – №. 2. – C. 285-291.
215. Yang T. A promising hepatocyte-like cell line, CCL-13, exhibits good liver function both in vitro and in an acute liver failure model / T. Yang, C. Li, L. Zhang, M. Li, P. Zhou // *Transplantation Proceedings*. – Elsevier, 2013. – V. 45. – №. 2. – C. 688-694.
216. Yang X. Synthesis, characterization, and anticancer activity of novel lipophilic emodin cationic derivatives / X. Yang, W. Zhao, X. Hu, X. Hao, F. Hong, J. Wang, L. Xiang, Y. Zhu, Y. Yuan, R. J.Y. Ho, W. Wang, J. Shao // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2015. – V. 86. – №. 6. – C. 1451-1457.

217. Zaman S. B. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing / S. B. Zaman, M. A. Hussain, R. Nye, V. Mehta, K. T. Mamun, N. Hossain // *Cureus*. – 2017. – V. 9. – №. 6. – E. e1403
218. Zavascki A. P. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review / A. P. Zavascki, L. Z. Goldani, J. Li, R. L. Nation // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2007. – V. 60. – №. 6. – C. 1206-1215
219. Zhang C.-J. Image-Guided Combination Chemotherapy and Photodynamic Therapy Using a Mitochondria-Targeted Molecular Probe with Aggregation-Induced Emission Characteristics / C.-J. Zhang, Q. Hu, G. Feng, R. Zhang, Y. Yuan, X. Lu, B. Liu // *Chemical science*. – 2015. – V. 6. – №. 8. – C. 4580-4586.
220. Zhang J. D. Introduction to the Data Analysis of the Roche xCELLigence System with RTCA Package / J. D. Zhang // 2012. – C. 1-13.
221. Zhang S. Mitochondria-Targeting Polymer Micelles in Stepwise Response Releasing Gemcitabine and Destroying the Mitochondria and Nucleus for Combined Antitumor Chemotherapy / S. Zhang, F. Zheng, K. Liu, S. Liu, T. Xiao, Y. Zhu, L. Xu // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – №. 20. – C. 12624.
222. Zhou T. Antimicrobial activity and synergism of ursolic acid 3-O- α -L-arabinopyranoside with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / T. Zhou, Z. Li, O. Kang, S. Mun, Y. Seo, R. Kong, D. Shin, X. Liu, D. Kwon // *International journal of molecular medicine*. – 2017. – V. 40. – №. 4. – C. 1285-1293.
223. Zielonka J. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications / J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, M. Hardy, O. Ouari, J. Vasquez-Vivar, G. Cheng, M. Lopez, B. Kalyanaraman // *Chemical reviews*. – 2017. – V. 117. – №. 15. – C. 10043-10120.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1 – Индекс селективности соединений в отношении
грамположительной бактерий и грибов в диссертацию?

№ соединения	ИС					
	IC ₅₀ (RPMI 1788)/ МИК (<i>B. cereus</i>)	IC ₅₀ (RPMI 1788)/ МБК (<i>B. cereus</i>)	IC ₅₀ (Chang liver)/ МИК (<i>B. cereus</i>)	IC ₅₀ (Chang liver)/ МБК (<i>B. cereus</i>)	HC ₅₀ / МИК (<i>B. cereus</i>)	HC ₅₀ / МБК (<i>B. cereus</i>)
1a	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-
2a	0.5	0.5	0.9	0.9	-	-
3a	2.0	1.0	0.9	0.4	-	-
4a	1.4	0.7	1.4	0.7	-	-
5a	1.0	1.0	1.9	1.9	18.4	18.4
6a	1.7	1.7	2.0	2.0	9.7	9.7
7a	1.7	0.9	2.8	1.4	9.6	4.8
8a	3.6	1.8	4.6	2.3	8.5	4.2
1б	0.8	0.2	1.7	0.4	-	-
2б	0.3	0.1	1.1	0.3	-	-
3б	0.9	0.9	2.6	2.6	-	-
4б	10.3	4.8	24.1	11.3	26.6	12.5
5б	26.6	6.2	47.6	11.2	25.1	5.9
6б	10.8	0.1	11.8	0.1	15.1	0.1
7б	1.3	0.0	3.2	0.1	2.4	0.1
8б	0.3	0.2	0.6	0.3	2.0	1.0
№ соединения	ИС					
	IC ₅₀ (RPMI 1788)/ МИК (<i>E. faecalis</i>)	IC ₅₀ (RPMI 1788)/ МБК (<i>E. faecalis</i>)	IC ₅₀ (Chang liver)/ МИК (<i>E. faecalis</i>)	IC ₅₀ (Chang liver)/ МБК (<i>E. faecalis</i>)	HC ₅₀ / МИК (<i>E. faecalis</i>)	HC ₅₀ / МБК (<i>E. faecalis</i>)
1a	0.4	0.2	0.4	0.2	-	-
2a	0.5	0.2	0.9	0.4	-	-
3a	1.0	1.0	0.4	0.4	-	-
4a	1.4	0.7	1.4	0.7	-	-
5a	0.5	0.5	0.9	0.9	9.2	9.2
6a	1.7	0.9	2.0	1.0	9.7	4.8
7a	13.4	13.3	22.4	22.2	75.9	75.0
8a	27.9	28.3	35.3	35.8	65.2	66.0
1б	0.2	0.2	0.4	0.4	-	-
2б	0.1	0.1	0.6	0.6	-	-
3б	0.4	0.2	1.3	0.7	-	-
4б	2.4	2.4	5.5	5.5	6.1	6.1
5б	23.9	12.1	42.8	21.7	22.6	11.4
6б	10.8	2.6	11.8	2.8	15.1	3.7
7б	0.3	0.2	0.8	0.4	0.6	0.3
8б	0.7	0.7	1.3	1.3	3.9	3.9
№ соединения	ИС					
	IC ₅₀ (RPMI 1788)/ МИК (<i>C. albicans</i>)	IC ₅₀ (RPMI 1788)/ МБК (<i>C. albicans</i>)	IC ₅₀ (Chang liver)/ МИК (<i>C. albicans</i>)	IC ₅₀ (Chang liver)/ МБК (<i>C. albicans</i>)	HC ₅₀ / МИК (<i>C. albicans</i>)	HC ₅₀ / МБК (<i>C. albicans</i>)
1a	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-
2a	0.1	0.1	0.2	0.1	-	-
3a	0.5	0.2	0.2	0.1	-	-
4a	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-
5a	0.3	0.1	0.5	0.1	4.6	1.1
6a	0.4	0.4	0.5	0.5	2.4	2.4
7a	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.3
8a	0.2	0.2	0.3	0.3	0.5	0.5

16	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-
26	0.0	0.0	0.1	0.1	-	-
36	0.1	0.1	0.2	0.2	-	-
46	1.2	1.2	2.8	2.8	3.0	3.0
56	3.0	3.0	5.4	5.4	2.9	2.9
66	2.6	2.6	2.8	2.8	3.6	3.6
76	1.3	1.3	3.2	3.2	2.4	2.4
86	0.2	0.2	0.3	0.3	1.0	1.0