

На правах рукописи

ЛЮБИНА АННА ПАВЛОВНА

**БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМОВ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО И
АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ФОСФОНИЕВЫХ СОЛЕЙ**

1.5.4 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2026 г.

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»

Научный руководитель: **Волошина Александра Дмитриевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией микробиологии Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра КазНЦ РАН

Официальные оппоненты: **Шаройко Владимир Владимирович** – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинского материаловедения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Егорова Ксения Сергеевна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов № 30 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"

Защита состоится «30» сентября 2026 г. В «10.00» часов на заседании диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференцзал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406). С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года

Ученый секретарь диссертационного совета
24.1.218.01 доктор биологических наук, доцент

Корытина Гульназ Фаритовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее изученности

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 [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 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 *S. 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).

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 (Bagi, 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 Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2017).

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в журналах рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 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 РНФ № 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 наименования 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 интерпретацию 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологические объекты

В работе были использованы 12 опухолевых клеточных линий человека M-HeLa клон 11, MCF-7, HuTu 80, PANC-1, A 549, T 98G, Hep G2, HL-60, PC-3, SK-OV-3, A-375, DU-145. В качестве условно-нормальных моделей для оценки селективности действия использованы линии Chang Liver и RPMI-1788. Их применение обусловлено доступностью и воспроизводимостью для первичного скрининга, что позволило оценить общую цитотоксичность соединений *in vitro*. Ограничения моделей учтены при интерпретации результатов. Культуры клеток были получены из коллекций

Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи (Россия), Института Цитологии РАН (Россия), Клеточного репозитория CSL (Германия) и типовой коллекции клеточных культур (ATCC. USA). Клетки культивировали на средах Игла-Мем, RPMI-1640, DMEM F12, DMEM (ПанЭко, Россия).

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 *S. 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 выращивания бактерий и Сабуро (БТН, Россия) для культивирования грибов.

Химические соединения и реагенты, используемые в работе

В работе были исследованы два гомологичных ряда новых производных фосфониевых солей: Дифенилалкил-2-гидроксифенилэтенилфосфоний хлориды (первый ряд соединений) и Алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды (второй ряд соединений) (Рисунок 1). 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 – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН под руководством Д.А. Татарина. В качестве препаратов сравнения были использованы субстанции антибиотиков: Норфлоксацин (Sigma, США), Амоксициллин (Sigma, США), Грамицидин С (Sigma, США), Доксорубин (Sigma, США) и Кетоконазол (Fisher Bioreagents, США).

Изучение цитотоксических свойств фосфониевых солей

Гемолитическую активность соединений оценивали путем сравнения оптической плотности раствора исследуемого соединения с оптической плотностью раствора крови при 100% гемолизе [Voloshina *et al.*, 2021]. Результаты представлены в значениях IC_{50} (концентрация вещества, при которой происходит разрушение 50% эритроцитов). Цитотоксичность соединений в отношении культур клеток оценивали с помощью МТТ теста. Индекс селективности (ИС) соединений определяли, как отношение их IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) для условно-нормальной

клеточной линии к IC₅₀ для опухолевых клеток. ИС рассчитывали относительно клеток Chang liver и RPMI 1788.

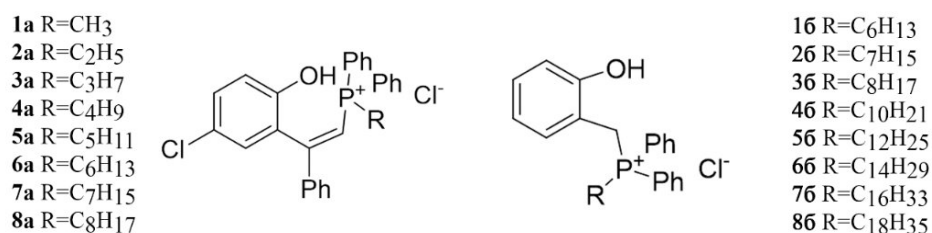


Рисунок 1. Структурные формулы исследуемых фосфониевых солей. Дифенилалкил-2-гидроксифенилэтенилфосфоний хлориды (первый ряд соединений) (1а-8а); Алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды (второй ряд соединений) (1б-8б).



Анализ индукции апоптоза проводили с использованием набора Annexin V-Alexa Fluor™ Apoptosis Detection Kit (Thermo, США). Оценку изменения митохондриального мембранного потенциала проводили с использованием Mitochondria Membrane Potential Kit (Sigma-Aldrich, США). Измерение клеточного окислительного стресса проводили с использованием красителя CellROX® Deep Red (Invitrogen, США). Изучение нарушений клеточного цикла проводили согласно опубликованной методике [Mamedov *et al.*, 2022]. Результаты получали методом проточной цитометрии (Guava easy Cyte, MERCK, США)

Оценка влияния исследуемых соединений на клетки M-HeLa в режиме реального времени была проведена при помощи xCELLigence S16 Real-time Analysis System RTCA (Acea Biosciences, США) [Zhang 2021]. Для анализа результатов использовали программное обеспечение RTCA Software 2.0.

Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза и генотоксичности 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. Значения интенсивности флуоресценции измеряли с помощью системы Luminex® MAGPIX® (Merck, США).

Изучение антимикробных свойств фосфониевых солей

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; CLSI, 1999].

Исследование развития лекарственной резистентности проводили по методике Lin с соавторами [Lin *et al.*, 2017]. Исследования антимикробной активности

фосфониевых солей по времени гибели проводили согласно методике Sianglum с соавторами [Sianglum *et al.*, 2011].

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].

Воздействие исследуемых фосфониевых солей на проницаемость цитоплазматической мембраны изучали методом окрашивания бактерий флуоресцентным красителем йодидом пропидия (PI) по методике Tuagi с соавторами [Tuagi *et al.*, 2015]. Визуализацию результатов проводили с использованием набора LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit. при помощи флуоресцентного микроскопа Nikon eclipse Ci-S (Nikon, Japan).

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].

Анализ морфологических изменений бактериальных клеток методом ПЭМ проводили совместно с Междисциплинарным центром «Аналитическая микроскопия» (КФУ, Казань). Подготовку образцов проводили по ранее опубликованной методике [Terekhova *et al.*, 2022].

Анализ протеомного профиля *S. aureus* проводили совместно с междисциплинарным центром протеомных исследований ИФМиБ КФУ (Казань) и лабораторией физико-химического анализа ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН. Анализ протеомного профиля *S. aureus* осуществляли методом двумерного электрофореза белков с дифференциальным окрашиванием. 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.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016 и Past4.17. Расчет IC₅₀, HC₅₀ производился с помощью онлайн-калькулятора: MLA - «Калькулятор Quest Graph™ IC50». 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. 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. Результаты исследования цитотоксичности и гемолитической активности наиболее перспективных исследуемых соединений приведены в таблице 1. 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 соединений 5а-8а IC_{50} составила 58-70 мкМ. Наиболее гемолитически активными веществами второго ряда оказались 4б-7б ($IC_{50} = 22-54$ мкМ). Тем не менее, данные показатели превосходят IC_{50} для препарата сравнения Грамицидина С, известного гемолитического агента.

Таблица 1. Цитотоксичность исследованных фосфониевых солей в отношении клеточных линий человека и эритроцитов крысы.

№	IC_{50} , мкМ							IC_{50} , мкМ
	M-HeLa	Du-145	Hep G2	MCF-7	SK-OV-3	Chang liver	RPMI 1788	
6а	6,1 ± 0,6	11,8±1,5	11±2,5	5,6±0,7	5,4±0,8	14,8 ± 1,4	12,6±2,1	70,5±8,1
7а	4,6 ± 0,4	10,6±2,1	13,1±5,5	4,9±0,5	5,4±0,9	20,2 ± 1,7	12,1±0,9	68,3±8,1
8а	6,4 ± 0,5	12,3±1,1	3,9±3,3	3,8±0,5	5,8±0,5	31,8 ± 3,0	25,1±10,6	58,65±5,1
4б	3,4 ± 0,2	3,9±0,4	12,3±1,2	13,2±1,1	2,6±0,5	45,7 ± 3,6	19,6±3,6	50,54±6,9
5б	2,6 ± 0,1	3,5±0,5	9,8±0,7	7,2±0,6	2±0,1	42,8 ± 3,3	23,9±5,6	22,56±3,5
6б	3,5 ± 0,3	11,8±2,1	6,6±0,5	6,6±0,5	5,4±0,9	42,3 ± 3,4	39,0±5,9	54,38±6,4
Докс	3,0±0,3	0,9±0,1	3,3±0,2	3,1±1,6	0,5±0,1	3,0±0,3	3,25±0,37	
ГрамС								9,4±0,8

(Докс) – Доксорубин; (ГрамС) – Грамицидин С

Эксперимент, проведенный на клеточных линиях человека, также продемонстрировал зависимость цитотоксических свойств от длины алкильного радикала у атома 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 M-HeLa = 2,6 мкМ, $IC_{Ch. liver} = 16,4$. 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 человека, а на перспективную избирательность в отношении некоторых опухолевых моделей *in vitro*.

При изучении механизма цитотоксического действия соединений был выявлен дозозависимый апоптоз (Рисунок 2). Причем и соединение 8а и 5б даже в концентрациях, превышающих IC_{50} приводили к увеличению клеток в состоянии раннего апоптоза. Из литературных источников известно, что фосфониевые соли могут накапливаться в митохондриях. В связи с этим было целесообразно выявить путь, по которому протекает апоптоз в клетках при воздействии соединений-лидеров 8а и 5б. Результаты продемонстрировали дозозависимое снижение митохондриального мембранного потенциала в клетках М-HeLa после обработки исследуемыми соединениями в концентрациях, соответствующих IC_{50} и превышающих ее вдвое (Рисунок 3). Причем наиболее сильное снижение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) 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].

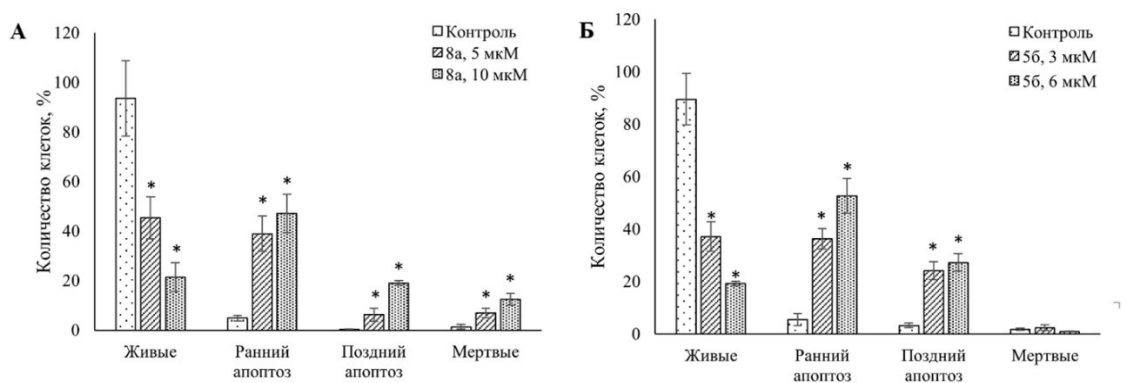


Рисунок 2. Индукция апоптоза в клетках М-HeLa в результате 24 ч воздействия исследуемых фосфониевых солей 8а (А) и 5б (Б). * - $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

Поэтому для выявления апоптотического пути был проведен мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза (Рисунок 7А). 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]. В образцах, обработанных веществами в концентрациях, близких к IC_{50} , обнаружено небольшое увеличение белка

Bad. Также стоит отметить увеличение уровня маркера p53, который запускает апоптоз в ответ на повреждения ДНК [Williams, Schumacher 2016].

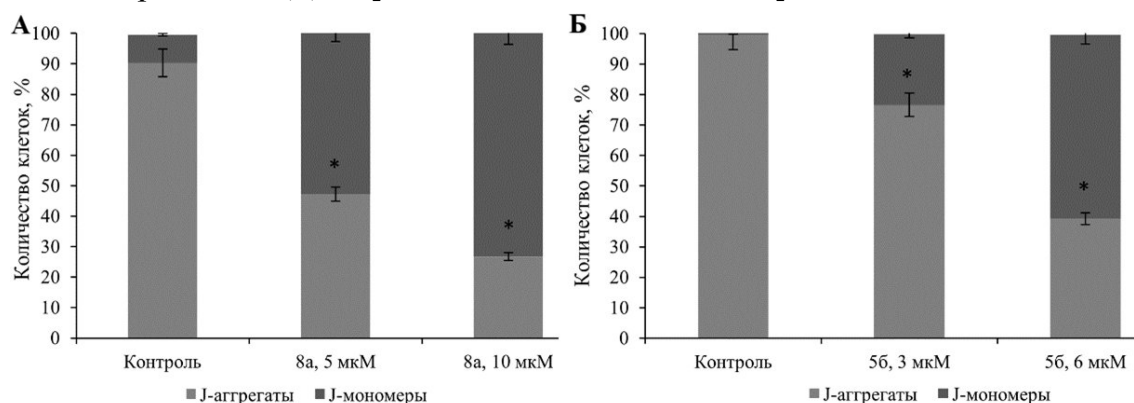


Рисунок 3. Изменение митохондриального мембранного потенциала клеток M-HeLa в результате 24 ч воздействия исследуемых фосфониевых солей 8a (A) и 5b (B). * - $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

Производство энергии за счет окислительного фосфорилирования — это основная функция митохондрий. Активные формы кислорода (АФК) постоянно образуются в живой клетке как продукты нормального метаболизма. 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]. 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].

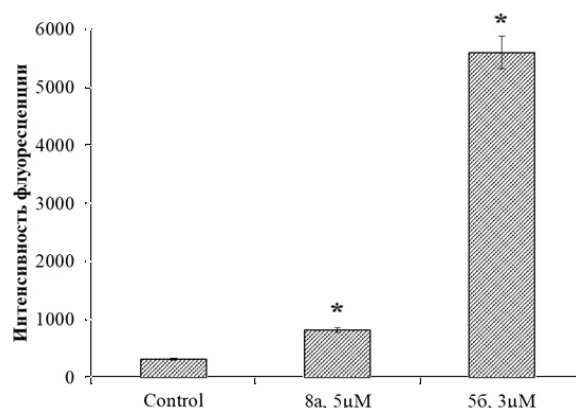


Рисунок 4. Уровень АФК в клетках M-HeLa в результате 24 ч воздействия исследуемых фосфониевых солей. * - $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом

Поэтому нами была изучена возможность исследуемых солей влиять на уровень АФК в раковых клетках М-HeLa. Результаты продемонстрировали значительное увеличение АФК, что еще раз подтверждает влияние веществ на митохондрии (Рисунок 4). Кроме того, известно, что накопление АФК может приводить к двухцепочечным разрывам ДНК. Ранее было выявлено увеличение белка p53, который реагирует на повреждения ДНК, приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу. Для понимания этого явления необходимо было изучить влияние исследуемых соединений на клеточный цикл.

В присутствии исследуемых соединений была продемонстрирована частичная остановка клеточного цикла в фазе G1 (Рисунок 5). Из чего следует, что вещества негативно влияют на пролиферацию клеток М-HeLa. В работах зарубежных и отечественных авторов также упоминаются фосфониевые соли, останавливающие клеточный цикл в этой фазе [Dhanya *et al.*, 2017].

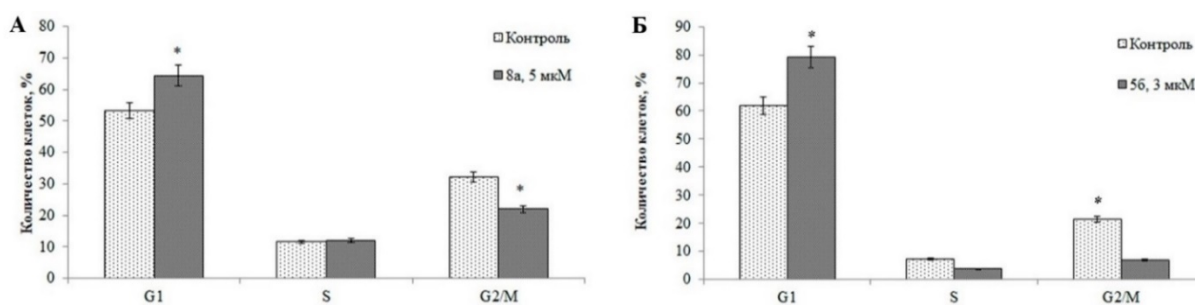


Рисунок 5. Влияние исследуемых фосфониевых солей на клеточный цикл клеток М-HeLa в результате 24 ч инкубации с веществами 8а (А) и 5б (Б). * - $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом

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, который способен проиллюстрировать биологическое состояние клеточной популяции в значениях безразмерного параметра, клеточного индекса (CI). В присутствии веществ в концентрациях, соответствующих IC_{50} наблюдается цитостатический эффект, гибель клеток происходит при более высоких концентрациях ($2 \times IC_{50}$) (Рисунок 6).

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 G1/S [Abassi *et al.*, 2009]. Данный эксперимент не только свидетельствует о негативном влиянии фосфониевых солей на пролиферацию клеток, но и подтверждает ранее полученные данные по нарушению клеточного цикла.

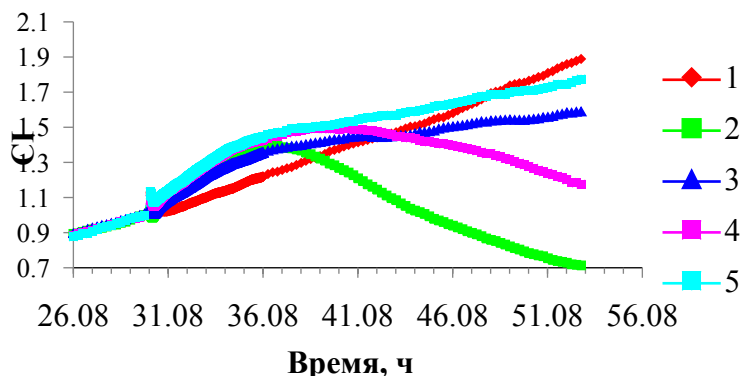


Рисунок 6. Изменение адгезивных свойств клеток M-HeLa при воздействии исследуемых соединений. 1- интактные клетки, 2 – 8а 10мкМ, 3 – 8а 5мкМ, 4 – 5б 6мкМ, 5 – 5б 3мкМ.

Так как ранее была 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 (Рисунок 7Б) позволяет комплексно оценить наличие повреждений ДНК и ответ клетки на данные повреждения.

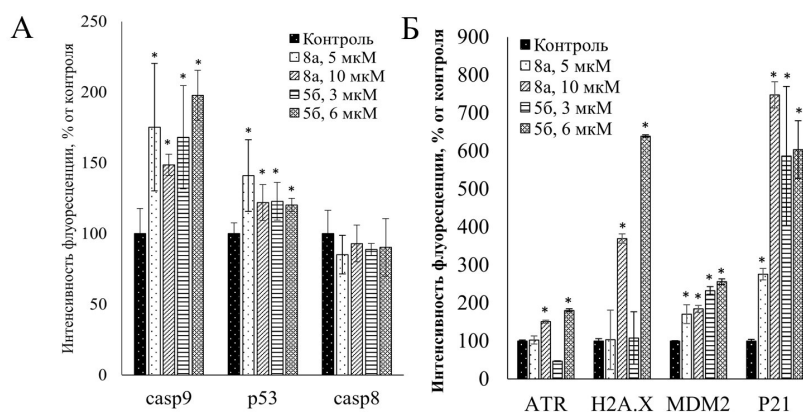


Рисунок 7. Мультиплексный анализ маркеров: А – раннего апоптоза и Б – маркеров повреждения ДНК/ генотоксичности в клетках M-HeLa в результате 24 ч воздействия исследуемых фосфониевых солей. * - $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

Значительное увеличение белков ATR и H2A.X после обработки исследуемыми соединениями, вероятно говорит о нарушении репликации и двухцепочечных разрывов ДНК (DSB, double strand breaks), 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 р53, который даже в малых концентрациях может активировать р21 [Желтухин, Чумаков, 2010]. Остановка клеточного цикла в фазе G1 подтверждается также и двумя методами, указанными выше.

2. Антимикробная активность новых производных фосфониевых солей

В результате скрининга новых производных фосфониевых солей было выявлено избирательное антибактериальное действие веществ на грамположительные бактерии (Таблица 2). В рядах протестированных фосфониевых солей антимикробная активность усиливается с увеличением длины алкильного радикала при атоме фосфора и достигает наилучших показателей у веществ 5а-8а и 4б-5б. Так в отношении штамма *S. aureus 209P* для данных соединений МИК = 1-7,5 мкМ. Кроме того, вещества были эффективны против грибов *C. albicans*, *MRSA*, а также обладали бактерицидными и фунгицидными свойствами, т.е. концентрации МИК и МБК/МФК отличались между собой не более чем в 4 раза. Исследуемые фосфониевые соли не обладают антибактериальной активностью против грамотрицательных бактерий. 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]. По всей видимости, наружная мембрана грамотрицательных бактерий является барьером для данных фосфониевых солей.

Таблица 2. Антимикробная активность исследуемых соединений

№ соединения	МИК/ 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>
6а	3,6±0,7/3,6±0,7	7,3±1,4/ 7,3±1,4	7,3±1,4/ 14,6±2,8	233,6±45,0/-	29,2±5,6/ 29,2±5,6
7а	7,1±1,3/28,4±5,5	7,1±1,3/ 14,2±2,7	0,9±0,2/ 0,9±0,2	-/-	227,7±21,4/227,7±21,4
8а	6,9±1,3/ 13,9±2,7	6,9±1,3/ 13,9±2,6	0,9±0,2/ 0,9±0,2	-/-	111,0±37,0/111,0±37,0
4б	1,0±0,2/4,1±0,8	1,9±0,3/ 4,1±0,8	8,3±1,6/ 8,3±1,6	-/-	16,6±3,2/ 16,6±3,2
5б	1,0±0,2/1,8±0,3	0,9±0,2/ 3,8±0,8	1,0±0,2/ 2,0±0,4	-/-	7,9±1,5/ 7,9±1,5
6б	3,6±0,7/14,9±2,9	3,6±0,7/476,6±91,7	3,6±0,7/ 14,9±2,9	-/-	14,9±2,9/ 14,9±2,9
НФ	7,5±1,4/ 7,5±1,4	24,4±4,7/ 24,4±4,7	12,2±2,4/98,0±18,9	4,7±0,9/ 4,7±0,9	
КТ					7,3±1,4/ 7,3±1,4

(—) МИК/ МБК (МФК)>1000 мкМ; (НФ) – Норфлоксацин; (КТ) – Кетоконазол

Антимикробные свойства исследуемых соединений, вероятно, 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. 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, в рядах исследованных соединений можно выделить соединения-лидеры, обладающие наибольшим антимикробным эффектом. Среди веществ первого и второго рядов такими соединениями являются 5а, 6а, 7а, 8а и 4б, 5б соответственно. Эти вещества продемонстрировали высокую антимикробную активность в отношении всех протестированных штаммов грамположительных бактерий. Для дальнейших исследований были выбраны соединения-лидеры 8а и 5б. При сравнении двух рядов соединений можно заключить, что Дифенилалкил-2-гидроксифенилэтенилфосфоний 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 сильными фунгицидными свойствами. 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.

При инкубации микроорганизмов в среде с содержанием низких концентраций антимикробных веществ, бактерии со временем могут выработать устойчивость к этим соединениям, как это было продемонстрировано с препаратами сравнения (Амоксициллин, Норфлоксацин). В то время как при воздействии 8а и 5б были зафиксированы МИК не более чем в 2 раза превышающие МИК для эталонного штамма *S. aureus* 209P (Рисунок 8).

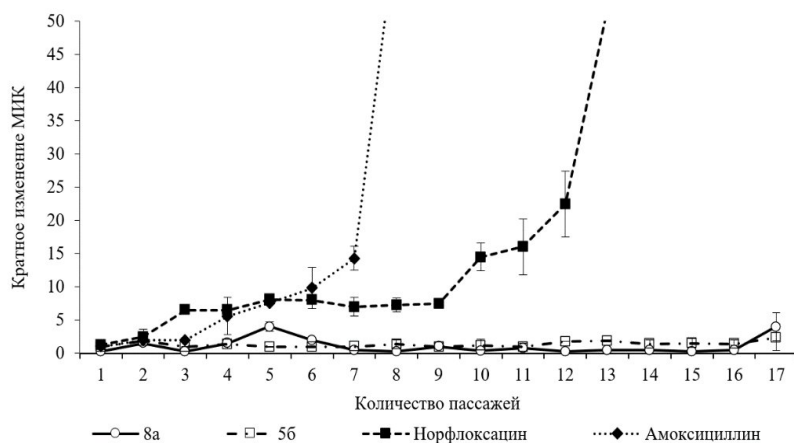


Рисунок 8. Динамика изменения антимикробной активности исследуемых соединений в отношении бактерий *S. aureus* в течение длительной инкубации.

Для оценки эффективности исследуемых соединений против микроорганизмов важно учитывать взаимодействие веществ с биопленками (Рисунок 9). После воздействия соединений 8a и 5b было продемонстрировано почти полное ингибирование образования биопленок в концентрациях, соответствующих $1/2 \times \text{МИК}$ и выше. Причем не было выявлено значительных различий между данными, полученными окрашиванием CV и МТТ.

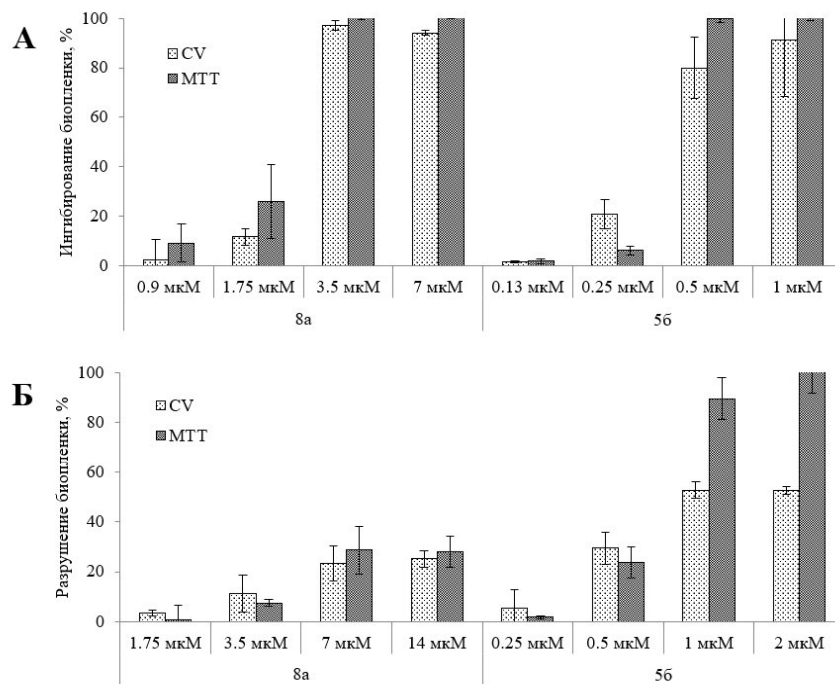


Рисунок 9. Подавление развития (А) и разрушение (Б) биопленки (%) *S. aureus* в результате 24 ч воздействия исследуемых соединений 8a и 5b в различных концентрациях, определенные с помощью красителя CV (общая плотность биопленки) и реагента МТТ (метаболическая активность клеток в биопленке).

При оценке разрушения уже сформированной биопленки значительный эффект был выявлен для соединения 5b в концентрациях, соответствующих МИК и $2 \times \text{МИК}$. Стоит отметить, что наибольший процент разрушения биопленки был продемонстрирован с помощью окрашивания реагентом МТТ, т.е. при воздействии 5b в этих концентрациях наблюдается значительное снижение количества метаболически активных клеток в популяции до 89-100%. Причем окрашивание CV выявило лишь 52% разрушения биопленки. Вероятно, это связано с взаимодействием красителя с веществами во внеклеточном матриксе и мертвыми клетками. Разрушение биопленок при воздействии соединения 8a в диапазоне исследуемых концентраций было продемонстрировано лишь на 25%. Таким образом, можно заключить, что соединение 5b эффективно даже против сформированных биопленок *S. aureus*.

Известно, что фосфониевые соли способны проникать через ЦПМ, в связи с чем были изучены мембранотропные свойства веществ: пермеабиллизация (оценивалось изменение флуоресценции красителя PI в клетках) и деполяризация (оценивалось изменение флуоресценции красителя DiSC3(5) в клетках) мембраны (Рисунок 10). Результаты исследования демонстрируют небольшие нарушения ЦПМ при воздействии веществ 8a и 5b, которые при повышении концентрации усугубляются.

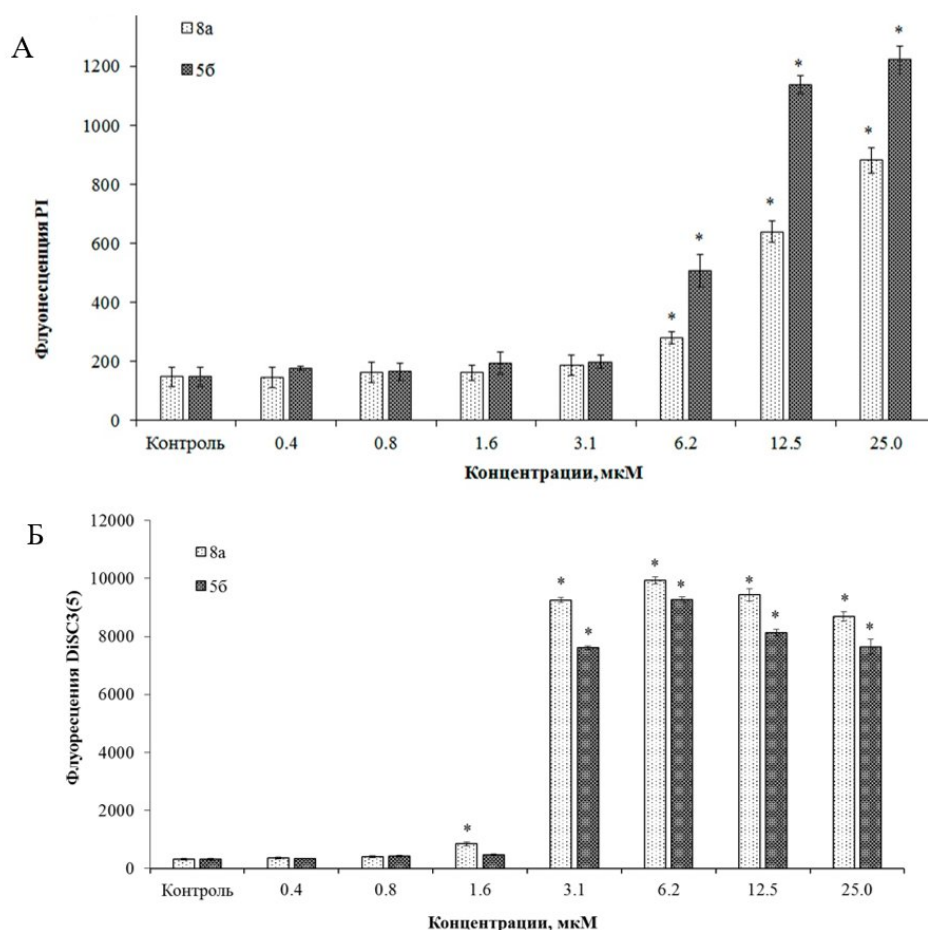


Рисунок 10. Оценка мембранотропных свойств соединений 8а и 5б. А – пермеабилзация ЦПМ, Б- деполаризация ЦПМ. * - $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом.

По фотографиям, полученным методом ПЭМ (Рисунок 11), можно подтвердить воздействие веществ на ЦПМ бактерий (в концентрации $10 \times \text{МИК}$ мембрана становится аморфной, плохо заметной структурой). Однако во всех образцах клеточная стенка остается четко различимой. Морфометрический анализ клеток *S. aureus* не выявил значительного изменения числа делящихся и начавших делиться клеток, а также их размера.

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. При воздействии 8а в концентрации $1 \times \text{МИК}$ и $10 \times \text{МИК}$ наблюдается экспрессия фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазы и метинилтетрагидрофолат циклогидролазы. В концентрации $1 \times \text{МИК}$ – аргинин-деименазы, молибдотрансферазы и универсального стрессового белка UspA. Экспрессия пептидогликан гидролазы, цистеин синтазы, АТФ-зависимой ДНК-хеликазы RuvA, енолазы, альдегиддегидрогеназы, тиоредоксина, глюкозамин-6-фосфат-изомеразы, 3-кетоацил-

АСР-редуктазы, этанол-активной дегидрогеназы/ ацетальдегид-активной редуказы наблюдается при воздействии концентрации $10\times$ МИК.

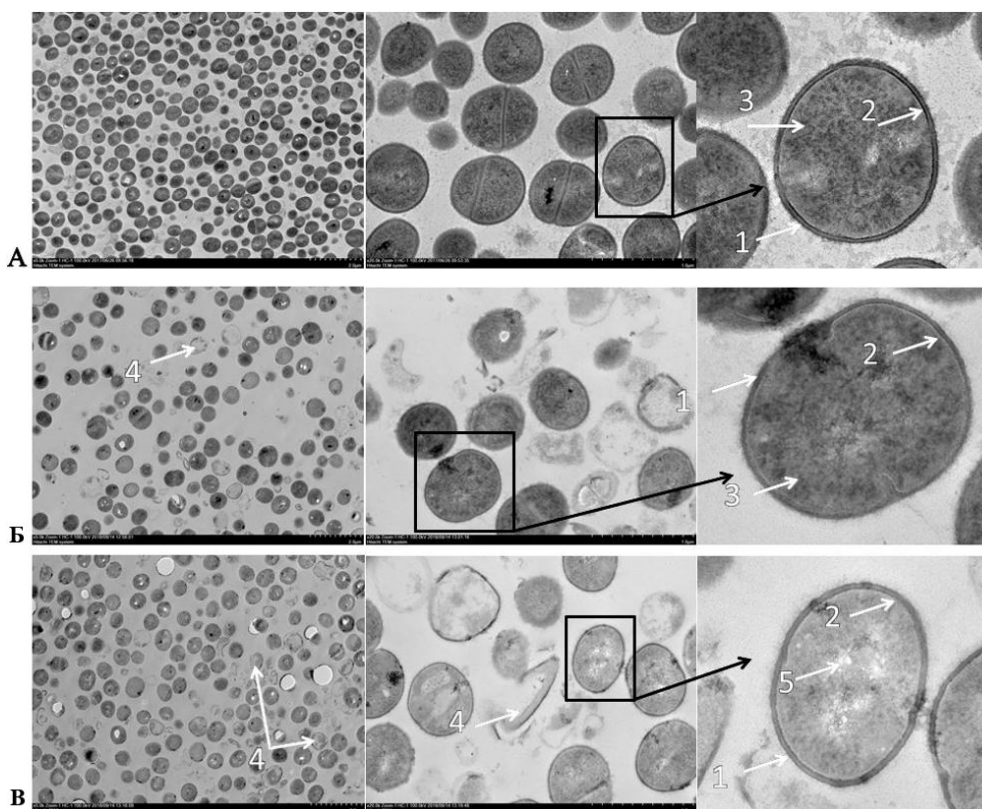


Рисунок 11. Микрофотографии *S. aureus*, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии. А – интактные клетки; Б- 8а ($1\times$ МИК); В – 5б ($10\times$ МИК); 1 – клеточная стенка; 2 – ЦПМ, 3 – цитоплазма, 4 – клетки в процессе лизиса, 5 – области с низкой электронной плотностью.

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 информацией между гомологичными участками ДНК, который способствует восстановлению двухцепочечных разрывов, горизонтальной передаче генов, увеличивает генетическое разнообразие популяции. Отмечается возрастание уровня универсального стрессового белка UspA. 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 (т.е. действие этого белка направлено на выживаемость популяции). Механизмы действия данного белка еще не до конца известны, но основная функция UspA — это борьба со стрессом.

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 гидроксibenзильного фрагмента (алкил-2-гидроксibenзилфосфоний хлориды) способствует усилению биологической активности соединений без повышения их токсичности в отношении условно-нормальных клеточных линий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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 Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship of 2-(2-hydroxyaryl) alkenylphosphonium salts with potency as anti-MRSA agents // *Bioorganic Chemistry*. – 2022. – Т. 127. – Номер статьи e106030 (17 с.). - <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106030> (WOS, SCOPUS, Q1, IF=4.7, ВАК, Глава 3).

2. N. V. Terekhova, D. A. Tatarinov, Z. M. Shaihutdinova, T. N. Pashirova, **A. P. Lyubina**, A. D. Voloshina, A. S. Sapunova, L. Ya. Zakharova, V. F. Mironov Design and Synthesis of Amphiphilic 2-Hydroxybenzylphosphonium Salts with Antimicrobial and Antitumor Dual Action // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – Т. 30 (13). – Номер статьи e127234 (7 с.). - <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127234> (WOS, SCOPUS, Q2, IF=2.2, ВАК, Глава 3).

3. **A. P. Lyubina**, A. D. Voloshina, S. K. Amerkhanova, A. S. Sapunova, D. A. Tatarinov, V. F. Mironov Membranotropic Property and Antibiofilm Efficacy of Novel Phosphonium Derivatives Bearing Phenolic Moiety // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2025. – Т. 61. №. 4. – С. 667-674. <https://doi.org/10.1134/S0003683824607017> (WOS, SCOPUS, Q3, IF=1.1, ВАК, Глава 3)

4. **А. П. Любина**, А. Д. Волошина, С. К. Амерханова, А. С. Сапунова, Д.А. Татаринов, В. Ф. Миронов ДНК-повреждающее действие и индукция апоптоза в клетках карциномы шейки матки под воздействием новых производных фосфониевых солей // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2025. – Т. 8. №. 1. – Номер статьи E. 00254 (9 с.). - <https://doi.org/10.18097/BMCRM00254> (ВАК, K2, Глава 3)

5. **А. П. Любина**, А. Д. Волошина, С. К. Амерханова, А. С. Сапунова, Д.А. Татаринов, В. Ф. Миронов Противоопухолевые свойства и механизм действия алкил-2-гидроксibenзилдифенилфосфониевых солей // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. – 2024. – Т. 20. №. 4. – С. 68-75. (ВАК, K3, Глава 3)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

$\Delta\Psi_m$ – митохондриальный мембранный потенциал

ТФФ⁺ – катион трифенилфосфония

ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

MRSA – метициллин-резистентный штамм *S. aureus*

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

МБК – минимальная бактерицидная концентрация

МФК – минимальная фунгицидная концентрация

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

CI – клеточный индекс

HC₅₀ – концентрация, при которой наблюдается разрушение 50% эритроцитов

ИС – индекс селективности