

**Абекова А.О.¹, Кенжебекова Р.Т.², Абрамова Ж.С.²,
Исламов Р.А.³, Нерсесян А.К.⁴, Ильин А.И.⁵**

¹PhD-докторант Казахского национального университета имени аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: asima_ashma@mail.ru

²младший научный сотрудник,

³кандидат биологических наук, начальник отдела, e-mail: renat-biochem@mail.ru

⁴доктор биологических наук, PhD, профессор, Институт исследований рака
Медицинского университета Вены, Австрия, г. Вена, e-mail: anersesyan@yahoo.com

⁵доктор химических наук, председатель правления

^{2,3,5}АО «Научный центр противомикробных препаратов», Казахстан, г. Алматы

**РАЗРАБОТКА АЛЬТЕРНАТИВНОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ
МЕСТНОРАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
КООРДИНАЦИОННОГО СОЕДИНЕНИЯ ИОДА *IN VITRO***

Развитие альтернативных методов в токсикологическом тестировании является актуальным по нескольким причинам: а) возможность протестировать большое количество веществ за сравнительно небольшой отрезок времени и в одинаковых условиях; б) наличие разнообразных моделей *in vitro*; в) снижение стоимости исследований за счёт замены лабораторных животных моделями *in vitro*. Одним из результатов этой работы становится гуманизация токсикологических исследований через уменьшение количества лабораторных животных, используемых в эксперименте. В связи с этим разработка метода оценки местнораздражающего действия некоторых веществ, обладающих заведомо коррозионным действием на слизистые оболочки, будет полезной, особенно для таких веществ, как иод и его комплексы с биоорганическими лигандами.

Целью данной работы являлась оценка возможности использования клеточной линии MDCK в качестве *in vitro* модели для изучения раздражающего действия новых координационных соединений иода (КС-143, КС-144, КС-145) с использованием МТТ-теста. Референсным веществом было лекарственное средство иод повидон (ПВП-иод), натриевая соль лаурилсерной кислоты (ЛСН) использовалась как хорошо изученное и рекомендованное для токсикологических исследований *in vitro* контрольное вещество.

В данной работе было показано, что ПВП-иод, ЛСН, КС-143, КС-144 и КС-145 показывают классическую дозозависимую цитотоксичность в отношении клеток MDCK. Цитотоксическая концентрация (ЦТК₅₀) для ПВП-иода достоверно ниже по сравнению с ЦТК₅₀ для КС. При этом цитотоксическое действие КС на MDCK не зависит от времени инкубации, от 3 до 72 часов.

Практическое значение работы заключается в том, что клеточную линию MDCK можно предложить в качестве альтернативной модели в скрининговых исследованиях местнораздражающего действия новых КС соединений иода.

Ключевые слова: альтернативный метод, MDCK, модель эпителиальных клеток *in vitro*, координационное соединение иода.

Abekova A.O.¹, Kenzhebekova R.T.², Abramova Zh.S.²,
Islamov R.A.³, Nersesyan A.K.⁴, Ilin A.I.⁵

¹PhD-student, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: asima_ashma@mail.ru

²junior scientific researcher, Kazakhstan, Almaty

³candidate of biological sciences, head of preclinical department, e-mail: renat-biochem@mail.ru

⁴doctor of biological sciences, PhD, professor, Institute of cancer research,
Medical University of Vienna, Austria, Vienna, e-mail: anersesyan@yahoo.com

⁵doctor of chemical sciences, chairman of the board

^{2,3,5}JSC «Scientific Center for Anti-Infectious Drugs», Kazakhstan, Almaty

Development of alternative method for studying the local irritant effect of coordinated compounds of iodine *in vitro*

The development of alternative methods in toxicological testing is relevant for several reasons: a) the ability to test a large number of substances in a relatively short time and under the same conditions; b) the presence of a variety of models *in vitro*; c) cost-effective for the research by replacing laboratory animals with *in vitro* models. One of the results of this work is the humanization of toxicological studies by reducing the number of laboratory animals used in the experiment. According to this, the development of a method for assessing the local irritant effect of certain substances that has well-known corrosive effect on the mucous membranes will be useful, especially for substances such as iodine and its complexes with bioorganic ligands.

The purpose of this work was to evaluate the possibility of using the MDCK cell line as an *in vitro* model for studying the irritant effect of new iodine coordinated compounds (CC-143, CC-144, CC-145) using the MTT test. The reference substance was povidone iodine (PVP-iodine), the sodium lauryl sulfate (SLS) was used as a well-studied control substance and recommended for toxicological studies *in vitro*.

It has been shown that PVP-iodine, SLS, CC-143, CC-144 and CC-145 demonstrate classical dose-dependent cytotoxicity against MDCK cell line. The cytotoxic concentration (CC₅₀) for PVP-iodine is significantly lower in comparison with the CC₅₀ for coordinated compounds. Moreover, the cytotoxic effect of CC on MDCK does not depend on the incubation time, from 3 to 72 hours.

The practical significance of the work lies in the fact that the MDCK cell line can be offered as an alternative model in screening studies of the local irritant effect of new CC iodine compounds.

Key words: alternative method, MDCK, model of epithelial cells *in vitro*, coordinated compound of iodine.

Абекова А.О.¹, Кенжебекова Р.Т.², Абрамова Ж.С.²,
Исламов Р.А.³, Нерсесян А.К.⁴, Ильин А.И.⁵

¹PhD-докторант, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті,
Қазақстан, Алматы қ., е-mail: asima_ashma@mail.ru

²кіші ғылыми қызметкері,

³биология ғылымдарының кандидаты, бөлім басшысы, е-mail: renat-biochem@mail.ru

⁴биология ғылымдарының докторы, PhD, профессор, Медициналық университетінің
онкологиялық зерттеулер институты, Австрия, Вена қ., е-mail: anersesyan@yahoo.com

⁵химия ғылымдарының докторы, басқарма төрағасы

^{2,3,5}АҚ «Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы», Қазақстан, Алматы қ.

Йодтың координациялық қосылыстарын *in vitro* жергілікті тітіркендіргіш әсерін зерттеудің балама әдістерін дамыту

Токсикологиялық тестілеуге баламалы әдістерін әзірлеу бірнеше себептер бойынша өзекті болып табылады: а) уақыт және бірдей жағдайында салыстырмалы түрде қысқа мерзім ішінде заттардың үлкен санын тексеру қабілеті; ә) *in vitro* түрлі моделдерінің болуы; в) *in vitro* моделдерімен зертханалық жануарларды ауыстыру арқылы зерттеулердің құнын төмендету. Осы жұмыстың нәтижелерінің бірі экспериментте пайдаланылатын зертханалық жануарлардың санын азайту арқылы токсикологиялық зерттеулерді гуманизациялау болып табылады. Осыған орай, шырышты қабаттарға белгілі коррозиялық әсерін бағалау әдісін әзірлеу пайдалы болады, әсіресе йод және оның комплекстерінің биоорганикалық лигандтары бар заттарына.

Бұл жұмыстың мақсаты МТТ-тестін пайдалана отырып, жаңа йодтың координациялық қосылыстардың (КҚ-143, КҚ-144, КҚ-145) тітіркендіргіш әсерін зерттеу үшін *in vitro* моделі ретінде MDCK жасушалық сызығын пайдалану мүмкіндігін бағалау болды. Референтті зат ретінде йод повидон (ПВП-йод) дәрілік заты болды, ал лаурилсульфат қышқылының натрий тұзы (ЛСК) *in vitro* бақылау затының токсикологиялық зерттеулер үшін жақсы зерттелген және ұсынылған зат ретінде пайдаланылды.

Осы мақалада ПВП-йод, ЛСК, КҚ-143, КҚ-144 және КҚ-145 MDCK клеткаларына классикалық дозаға тәуелді цитотоксикалық әсерін көрсетті. ПВП-йод цитотоксикалық концентрациясы

(ЦТК₅₀) КК ЦТК₅₀ салыстырғанда айтарлықтай төмен. Сонымен қатар КК цитотоксикалық әсері инкубация уақытына байланысты емес, 3-тен 72 сағатқа дейін.

Жұмыстың тәжірибелік маңыздылығы – MDCK жасушаларын баламалы модель ретінде жаңа йод КК-ның жергілікті тітіркендіргіш әсерін скринингтік зерттеулерде балама үлгі ретінде ұсынуға болады.

Түйін сөздер: баламалы әдіс, MDCK, *in vitro* эпителий жасушаларының моделі, йод координациялық қосылысы.

Введение

Перед современной наукой все более остро встают проблемы этического, рационального и экономного использования лабораторных животных, особенно в области доклинических исследований лекарственных препаратов, чем, в частности, объясняется стремительное развитие альтернативных методов исследований за последние 20 лет (Cinelli, 1991: 52). Классические методы доклинических исследований подразумевают применение большого числа лабораторных животных для оценки токсического действия химических соединений (Majda, 1973: 322). Однако исследования *in vivo* являются дорогостоящими и трудоемкими, что является одной из проблем при поиске путей интенсификации исследований и снижения их себестоимости. Поэтому логическим решением сложившейся проблемы служит применение доклинических тестов на простых биологических моделях *in vitro*.

Другим стимулирующим фактором развития и применения альтернативных методов послужил запрет на проведение испытаний на лабораторных животных в Европе. Седьмая поправка к директиве Евросоюза ЕЭС 76/768/ЕЕС (Cosmetics Directive) ввела положение по гуманному отношению к испытаниям на теплокровных животных.

Всемирная организация здравоохранения, международное медико-биологическое общество не только рекомендуют, но и поддерживают разработку и использование альтернативных моделей и методов в токсикологии (Завьялов, 1998: 279).

По правилам нового Европейского законодательства, которое вступило в силу в 2007 году, тестирование в условиях *in vitro* включены в перечень обязательных методов оценки потенциальной опасности химических веществ для здоровья человека и окружающей среды (Cinelli, 1991: 52).

Альтернативные токсикологические методы дают возможность:

- уменьшить (*reduce*) количество животных необходимых для тестов,

- усовершенствовать (*refine*) токсикологические процедуры, делая их менее болезненными или стрессовыми для лабораторных животных, или

- полностью заменить (*replace*) эксперименты на животных методами *in vitro*, *ex vivo* или *in silico*.

Эти принципы «трех R» были сформулированы в 1959 году в труде «The Principles of Humane Experimental Techniques» (Russell, 1959: 238).

Если сравнивать токсикологические методы, проводимые на животных, с исследованиями на культурах клеток, можно выделить ряд преимуществ клеточных культур: возможность проводить эксперименты с малым количеством вещества в скрининговых испытаниях; тесты на культуре клеток позволяют более точно воздействовать на мишень и четко проследить зависимости «доза-эффект» и «структура-активность»; высокая технологичность процесса исследований, что позволяет проводить скрининг одновременно нескольких исследуемых веществ (Ekwall, 1999: 340).

Поэтому на сегодняшний день разработано множество *in vitro* моделей, заменяющих испытания *in vivo*: срезы тканей (Трахтенберг I.M., 2008: 272), изолированные органы (глаз цыпленка), культуры клеток, имитирующие ткани (эмбриональные фибробласты, кератиноциты человека, кролика и крысы), и даже специализированные коммерческие модели (EpiSkin, SkinEthic, EpiDerm), являющиеся трехмерными моделями кожи человека (Wilson, 2015: 33; Hoffmann, 2006: 179).

Однако большинство *in vitro* моделей предназначено для оценки кожного раздражающего действия исследуемых веществ, хотя при оральном их приеме под воздействием оказываются, в первую очередь, слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, представленные однослойным эпителием, которые могут быть подвергнуты весьма болезненному коррозионному разрушению (Contini, 2013: 3920). Большинство *in vitro* моделей, имитирующих слизистую ткань ЖКТ, представлены иммортализованными

ми опухолевыми клеточными линиями, которые, вследствие своего происхождения, имеют собственные анатомические и биохимические особенности и ограничены в использовании. В свою очередь культура первичных клеток ЖКТ, вследствие ограниченной жизнеспособности, так же не подходит для подобных исследований. (Gordon, 2015: 341).

Вопрос касательно повреждающего действия на слизистые оболочки и эпителий ЖКТ остро стоит при использовании лекарственных препаратов на основе комплексов иода, которые обладают цитотоксическим свойством, однако применяются в диагностических целях, в лечении мукозитов, сопровождающих противоопухолевую терапию и т.д. (Tsurumaru, 2010: 2; Kanagalingam, 2017: 341).

Комплексные соединения иода (КС) вызывают растущий интерес, благодаря расширению диапазона применения и наличию особой пространственной конфигурации молекул. В работах Юлдашевой Г.А. и др. установлено, что КС (патент РК №20129000 (Ilin, 2014)) внутри декстриновой спирали содержат три активных центра: молекулярный иод, координированный полипептидом и галогенидом лития; трийодид и галогениды лития. Показано, что КС способны образовывать комплексы с азотистыми основаниями и фосфатной группой ДНК клеток. Эти комплексы ингибируют активный центр топоизомеразы I через воздействие на аминокислотные остатки аргинина и тирозина (Yuldasheva, 2016: 76).

Поэтому исследование повреждающего действия иодсодержащих веществ на клетки слизистых оболочек и поиск альтернативных методов для этих целей остаются актуальными.

В данной работе в качестве альтернативной модели использовалась нормальная клеточная линия MDCK, имеющая эпителиальные маркеры и способность образовывать монослой с плотными соединениями, подобный клеткам эпителия желудочно-кишечного тракта. Клеточная линия MDCK была получена от взрослой собаки породы кокер-спаниель (Madin, 1958: 575). MDCK использовалась с начала 1960-х годов преимущественно для вирусологических исследований, и к 1966 году была полностью охарактеризована (Gaush, 1966: 933). Она остается одной из самых изученных поляризованных клеточных линий, по-прежнему очень напоминающих эпителии с точки зрения морфологии и регуляции роста после почти 20 лет культивирования *in vitro* (Taub, 1979: 554; Taub, 1981: 65).

Целью данной работы являлась оценка возможности использования клеточной линии MDCK для изучения раздражающего действия новых координационных соединений иода с использованием МТТ-теста.

Материалы и методы исследования

1 Клетки и реагенты

В качестве объекта исследования в работе использовалась культура эпителиальных клеток почки собаки MDCK (Лаборатория Клеточной биотехнологии, Россия). Клеточную культуру поддерживали в среде RPMI-1640 с L-глутамином (Sigma, США) и раствором антимикробных и антигрибковых препаратов (10000 Ед пенициллина и 10 мг стрептомицина, на 1 мл) (Sigma, США), дополненной 10% инактивированной фетальной бычьей сывороткой (Sigma, США). Клетки инкубировали при 37°C и 5%-ном содержании CO₂ в атмосфере. Для пересева клеточной линии использовали однократный сбалансированный солевой раствор Хэнкса (Sigma, США) и стерильный 0,25% раствор Trypsin-EDTA (Sigma, США). Жизнеспособность клеток оценивали при помощи включения трипанового синего (Sigma, США). В эксперименте использовали клеточную культуру с процентом жизнеспособных клеток больше 90 %.

2 Исследуемые вещества

Исследуемые вещества – координационные соединения (КС) или аддукты молекулярного иода с полипептидами, α-декстрином и галогенидами калия и лития. В данной работе изучались три координационных соединения различного состава (КС-143, КС-144, КС-145), синтезированные по методу описанного в патенте РК №20129000 (Ilin, 2014).

В качестве положительного контроля использовали натриевую соль лаурилсерной кислоты (ЛСН) (AppliChem, Германия) и референсного вещества – иод повидон (ПВП-иод) (DOSFARM, Казахстан). ЛСН является анионным поверхностно-активным веществом. По рекомендациям OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) ЛСН рекомендован в качестве контрольного цитотоксического вещества для оценки токсического действия веществ и валидации методов (OECD, 2013). ПВП-иод использовался в качестве иодсодержащего референсного вещества (Fukuda, 2003: 66).

3 Анализ пролиферации клеток

Клетки рассевали на 96-луночные плашки (BRAND plates, Германия) в концентрации 3x10⁴

клеток на 1 ячейку. Плашки культивировали в термостате при 37,0 °С, 5 % CO₂. Из лунок планшета через 24 часа инкубации удаляли ростовую среду, и вносили по 200 мкл среды, содержащей различные концентрации исследуемых веществ (диапазон концентрации для КС – от 13 мкг/мл до 7,8 мг/мл, для ПВП-иода – от 6,4 мкг/мл до 5 мг/мл, и для ЛСН – от 2,0 нг/мл до 12,5 мг/мл). В лунки с отрицательным контролем вносили по 200 мкл питательной среды без добавления веществ.

Влияние комплексов LiCl(I)- α -I₂-декстрин КС на жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа поглощения клетками 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) (Sigma, США). Определение жизнеспособности клеток методом МТТ основано на измерении активности клеточной митохондриальной дегидрогеназы (Mosmann T., 1983: 55-60). Метод обнаруживает живые клетки, и генерируемый сигнал зависит от степени их активации. Поэтому этот метод использовался для оценки раздражающего действия веществ.

Местно-раздражающее действие веществ оценивали по истечению определенного времени воздействия (через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч). После 3 – 72 часового воздействия исследуемыми препаратами в каждую лунку вносили по 20 мкл МТТ-реagenta (Sigma, США) (5 мг/мл) и инкубировали еще 4 часа при 37° С. Для растворения формазана в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметисульфоксида (DMSO) (Sigma, США).

Фотометрическое измерение оптической плотности растворенного формазана производили на микропланшетном ридере Sunrise RC.4 (Tecan, Австрия) при длине волны основного фильтра – 540 нм и референтной волне – 620 нм. Концентрацию препарата, уменьшающую значение оптической плотности на 50% по сравнению с контролем клеток, принимали за 50 % цитотоксическую концентрацию (ЦТК₅₀).

4 Математические и статистические методы.

Для проверки зависимости ЦТК₅₀ от времени инкубации использовали регрессионный анализ. Все исследования проводили в трех повторностях. Достоверность различий между экспериментальными данными оценивали при помощи критерия Стьюдента при уровне достоверности $p < 0,05$. Статистические расчеты были проведены в программе GraphPad Prism v6 (GraphPad software, La Jolla, California).

Результаты исследования и их обсуждения

В таблице 1 представлены концентрации КС-143, КС-144, КС-145, ПВП-иод и ЛСН приводящие к 50% гибели клеток MDCK, среднее значение ЦТК₅₀ для всех интервалов инкубации и коэффициент детерминации r^2 или квадрат коэффициента корреляции, позволяющий оценить качество уравнения регрессии (ЦТК₅₀ на время). Графики линейной регрессии для КС-143, КС-144, КС-145, ЛСН и ПВП-иода показаны на рисунке 1.

Таблица 1 – ЦТК₅₀ (мг/мл) для исследуемых веществ и коэффициенты детерминации r^2 линейной регрессии (концентрация на время) на клеточной линии MDCK

Вещество	Время воздействия исследуемых веществ, ч						Ср. Знач. ЦТК ₅₀	r^2
	3	6	12	24	48	72		
КС-143	0,50 ± 0,13	0,39 ± 0,10	0,49 ± 0,10	0,51 ± 0,16	0,42 ± 0,05	0,41 ± 0,13	0,45 ± 0,11	0,196
КС-144	0,52 ± 0,20	0,45 ± 0,10	0,53 ± 0,16	0,56 ± 0,06	0,50 ± 0,15	0,37 ± 0,07	0,49 ± 0,12	0,396
КС-145	0,41 ± 0,09	0,45 ± 0,13	0,45 ± 0,10	0,40 ± 0,10	0,44 ± 0,12	0,38 ± 0,15	0,42 ± 0,12	0,295
ПВП-иод	0,20 ± 0,05	0,25 ± 0,04	0,21 ± 0,05	0,22 ± 0,04	0,16 ± 0,11	0,17 ± 0,09	0,20 ± 0,06*	0,603
ЛСН	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01*	0,142

Примечание: * $p < 0,05$ против КС-143-145

Новые КС иода (КС-143, КС-144 и КС-145) характеризуются более низкой цитотоксической активностью в отношении клеток MDCK, чем ПВП-иод. Эти результаты доказывают зависимость токсичности соединений иода от природы

координирующих лигандов (Wutzler P., 2002: 92; Noda Y., 2009: 88).

Кроме того, клетки MDCK оказались более чувствительными к ПВП-иоду, чем, например, фибробласты мышей (Müller, 2008: 1283)

или клетки нейробластомы человека SH-SY5Y (Doan, 2012: 135), для которых значения ЦТК₅₀ составили, 4,75 и 1,1 мг/мл, соответственно.

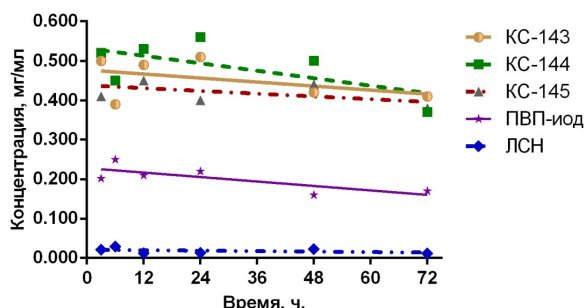


Рисунок 1 – Линейная регрессия ЦТК₅₀ на время для KC-143, KC-144, KC-145, ПВП-иод и ЛСН

Контрольное вещество ЛСН характеризуется достаточно постоянной высокой цитотоксичностью в интервале 3 – 72 часа (Rusanov, 2017: 134).

Рассчитанные коэффициенты детерминации показывают отсутствие корреляции между временем воздействия и ЦТК₅₀ для КС и ЛСН ($r^2 < 0,5$) и слабую зависимость для ПВП-иода ($r^2 = 0,603$) (Kataoka, 2006: 635), что указывает на возможность использования любого временного интервала для оценки раздражающего действия КС иода.

Исходя из полученных результатов, в дальнейшем цитотоксичность КС изучали после 24 ч инкубирования. На рисунке 2 представлены кривые зависимости «доза-эффект» для КС-143,

КС-144, КС-145 и ПВП-иод в логарифмическом масштабе после 24 ч воздействия на клетки MDCK.

Log-кривые «доза – эффект» для КС-143, КС-144, КС-145 и ПВП-иод характеризуются классической сигмоидальной формой.

После определения ЦТК₅₀ для КС был проведен морфологический анализ клеточной культуры после 24-х часового воздействия веществами, негативным контролем служили клетки без воздействия (рисунок 3).

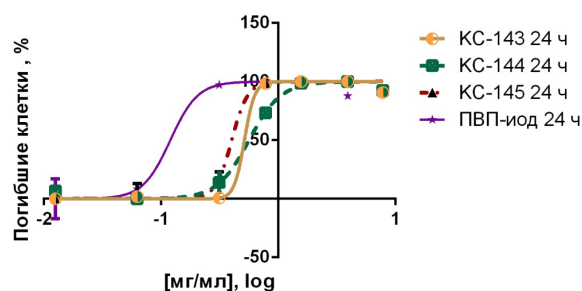


Рисунок 2 – Log кривая «доза – эффект» для КС-143, КС-144, КС-145 и ПВП-иод на культуре MDCK

После 24 часов воздействия КС наблюдались: нарушение клеточной мембраны, переход к компактной округлой структуре и потеря адгезивной способности (разрушение монослоя показано стрелками, рисунок 3Б). Встречающиеся некротические клетки свидетельствует о наличии прямого цитотоксического действия КС на клетки MDCK в исследованных концентрациях.

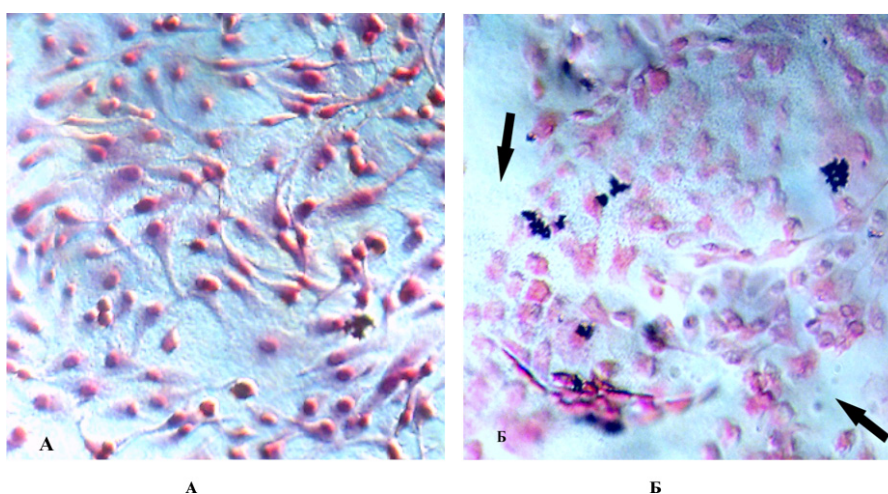


Рисунок 3 – Микрофотографии клеточной культуры MDCK.

А – без воздействия, Б – после 24 ч. воздействия КС 0,2 мг/мл (окраска: по Романовскому – Гимзе), увеличение: 10x10

Заключение

В исследовании было показано, что цитотоксическое действие КС иода на клетки MDCK не зависит от продолжительности воздействия. ПВП-иод вдвое токсичнее, чем КС-143, 144 и 145. Воздействие КС в ЦТК₅₀ на линию MDCK вызывает клеточную гибель, что может трактоваться как коррозионное действие. Учитывая та-

кие свойства культуры клеток MDCK, как: 1) однородность популяции с эпителиальной формой, 2) возможность выращивать в значительных количествах, 3) близкая морфология к эпителию ЖКТ и 4) возможность оценить прямое повреждающее действие КС на клетки; предлагаемая модель может быть альтернативным скрининговым методом для изучения раздражающего (коррозийного) действия новых соединений.

Литература

- Cinelli S., Falezza A., Meli C. [et al.] Alternative methods in toxicology tests: in vitro toxicity // *Cytotechnology*. – 1991. – Vol. 5, No 1. – P. 51-54 (European Commission-Enterprise and Industry-REACH – Overview-FAG. Web page: http://eu.europa.eu/enterprise/reach/fag_en.htm).
- Majda A., Chuscielska K. Estimation of damaging effects of chemicals on the mucous membrane rabbit eyes // *Medicine Pracy*, XXIV, – 1973. – Vol. 3. – P. 321-336.
- ЕЭС 76/768/ЕЕС (Cosmetics Directive) Directive 2003/15/EC of 27 February 2003 is the 7th amendment to the law.
- Завьялов Н.В., Червонская Г.П., Панкратова Г.П. и др. Ускоренное изучение цитотоксического действия в экспресс-тестах in vitro // Сб. тезисов докл. 1-го съезда токсикологов. – 1998. – Москва. – С. 279.
- Russell W.M.S., Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Techniques* // Methuen and Co., London, UK, – 1950. – P. 238.
- Ekwall B., Clemedson C., Ekwall B. [et al.] EDIT: a new international multicentre programme to develop and evaluate batteries of in vitro tests for acute and chronic systemic toxicity // – 1999. – Vol. 27. – P. 339-349.
- Трахтенберг І.М., Коваленко В.М., Кокшарьова Н.В., Жмінко П.Г. Альтернативні методи і тест-системи. Лікарська токсикологія // АМН України І.М. Трахтенберга. – 2008. – С. 272.
- Wilson S.L., Ahearne, M., Hopkinson, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. // *Toxicology* 327. – 2015. – P. 32–46.
- Hoffmann S., Hartung T. Designing validation studies more efficiently according to the modular approach: Retrospective analysis of the EPISKIN test for skin corrosion // *Altern Lab Anim* 34. – 2006. – P. 177-191.
- Contini S., Scarpignato C. Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: A comprehensive review // *World Journal of Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 19, No 25. – P. 3918-3930.
- Gordon S., Daneshian M., Bouwstra J., [et al.] Non-Animal Models of Epithelial Barriers (Skin, Intestine and Lung) in Research // *Industrial Applications and Regulatory Toxicology*. – 2015. – *Altex* 32(4). – P. 341.
- Tsurumaru D., Utsunomiya T., Matsuura S., Komori M., Kawanami S., Ishibashi T., Honda H. Gastric mucosal changes caused by Lugol's iodine solution spray: endoscopic features of 64 cases on screening esophagogastroduodenoscopy // *Gastroenterology Research and Practice*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1-4.
- Kanagalingam J., Chopra A., Hong M.H., Ibrahim W., Villalon A., Lin J-C. Povidone-iodine for the management of oral mucositis during cancer therapy // *Oncology Reviews*. – 2017. – Vol. 11(2). – P.341.
- Ilin A.I., Kulmanov M.E. Antibacterial agent for treating infectious diseases of bacterial origin // – 2014. – Patent 389 US 2014/0010782 A1
- Yuldasheva G.A., Zhidomirov G.M., Abekova A.O., Ilin A.I. The Mechanism of Anti-Cancer Activity of Complexes of Molecular Iodine with α -Dextrins and Polypeptides and Lithium Halogenides // *Journal of Antivirals and Antiretrovirals*. – 2016. – Vol. 8. – P. 072-078. DOI:10.4172/jaa.1000138.
- Madin S.H., Darby N.B. U.S. Dept. HEW, P.H.S. Registry of Animal Cell Lines // *Proc Soc Exp Biol Med*. – 1965. – Vol. 98. – P. 574-576.
- Gaush C.R., Hard W.L., Smith T.F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK), *Proc Soc Exp Biol Med*. – 1966. – Vol. 122. – P. 931-935.
- Taub M., Ue B., Chuman L., Rindler M.J., Saier M.H. Alterations in growth requirements of kidney epithelial cells in defined medium associated with malignant transformation. // *Methods Enzymol*. – 1979. – Vol. 58. – P. 552-560.
- Taub M., Ue B., Chuman L., Rindler M.J., Saier M.H. *Supramolecule Structure* // – 1981. – Vol. 15. – P. 63-72.
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals Section 4: Health Effects. Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method. – 2013. – DOI: 10.1787/9789264203822-en.
- Fukuda M., Murano H., Yamashiro Y., Takahashi N. *Journal Investigative Ophthalmology & Visual Science: Effects of Povidone Iodine on Cultured Corneal Epithelial Cells* // *ARVO Annual Meeting Abstract*. – 2003. – Vol. 44, Issue 13. – P. 66.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65, No 1-2. – P. 55-63.

- Wutzler P., Sauerbrei A., Klöcking R., Brögmann B., Reimer K. Virucidal activity and cytotoxicity of the liposomal formulation of povidone-iodine // *Antiviral Res.* – 2002. – Vol. 54, No 2. – P. 89-97.
- Noda Y., Fujii K., Fujii S. Critical evaluation of cadexomer-iodine ointment and povidone-iodine sugar ointment // *Int J Pharm.* – 2009. – Vol. 8, No. 372(1-2). – P.85-90.
- Müller G., Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity // *J Antimicrob Chemother.* – 2008. – Vol. 61, No 6. – P. 1281-1287.
- Doan L., Piskoun B., Rosenberg A.D., Blanck T.J., Phillips M.S., Xu F. In vitro antiseptic effects on viability of neuronal and Schwann cells // *Reg Anesth Pain Med.* – 2012. – Vol. 37, No 2. – P. 131-138.
- Rusanov A.L., Luzgina N.G., Lisitsa A.V. Sodium dodecyl sulfate cytotoxicity towards HaCaT keratinocytes: comparative analysis of methods for evaluation of cell viability // *Bull Exp Biol Med.* – 2017. – Vol. 163, No 2. – P. 284-288.
- Kataoka M., Tsumura H., Kaku N., Torisu T. Toxic effects of povidone-iodine on synovial cell and articular cartilage // *Clin Rheumatol.* – 2006. – Vol. 25, No 5. – P.632-638.

References

- Cinelli S., Falezza A., Meli C. [et al.] (1991) Alternative methods in toxicology tests: in vitro toxicity. *Cytotechnology*, vol. 5, no. 1, pp. 51-54 (European Commission-Enterprise and Industry-REACH – Overview-FAG. Web page: http://eu.europa.eu/enterprise/reach/fag_en.htm).
- Contini S., Scarpignato C. (2013) Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: A comprehensive review., *World Journal of Gastroenterology*, vol. 19, no. 25, pp. 3918-3930.
- Doan L., Piskoun B., Rosenberg A.D., Blanck T.J., Phillips M.S., Xu F. (2012) In vitro antiseptic effects on viability of neuronal and Schwann cells. *Reg Anesth Pain Med.*, vol. 37, no. 2, pp. 131-138.
- Ekwall B., Clemenson C., Ekwall B. [et al.] (1999) EDIT: a new international multicentre programme to develop and evaluate batteries of in vitro tests for acute and chronic systemic toxicity., vol. 27, pp. 339-349.
- ЕЭС 76/768/ЕЕС (Cosmetics Directive) Directive 2003/15/EC of 27 February 2003 is the 7th amendment to the law.
- Fukuda M., Murano H., Yamashiro Y., Takahashi N. (2003) Effects of Povidone Iodine on Cultured Corneal Epithelial Cells. *Journal Investigative Ophthalmology & Visual Science*, ARVO Annual Meeting Abstract., vol. 44, Issue 13, pp. 66.
- Gaush C.R., Hard W.L., Smith T.F. (1966) Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK), *Proc Soc Exp Biol Med.*, vol. 122, pp. 931-935.
- Gordon S., Daneshian M., Bouwstra J., [et al.] (2015) Non-Animal Models of Epithelial Barriers (Skin, Intestine and Lung) in Research. *Industrial Applications and Regulatory Toxicology*, *Altex* 32(4), p. 341.
- Hoffmann S., Hartung T. (2006) Designing validation studies more efficiently according to the modular approach: Retrospective analysis of the EPISKIN test for skin corrosion. *Altern Lab Anim* 34., pp. 177-191.
- Ilin A.I., Kulmanov M.E. (2014) Antibacterial agent for treating infectious diseases of bacterial origin. Patent 389 US 2014/0010782 A1
- Kanagalingam J., Chopra A., Hong M.H., Ibrahim W., Villalon A., Lin J-C. (2017) Povidone-iodine for the management of oral mucositis during cancer therapy., *Oncology Reviews*., vol. 11(2), p.341.
- Kataoka M., Tsumura H., Kaku N., Torisu T. (2006) Toxic effects of povidone-iodine on synovial cell and articular cartilage. *Clin Rheumatol.*, vol. 25, no. 5, pp.632-638.
- Madin S.H., Darby N.B. (1965) U.S. Dept. HEW, P.H.S. Registry of Animal Cell Lines. *Proc Soc Exp Biol Med.*, vol. 98, pp. 574-576.
- Majda A., Chuscielska K. (1973) Estimation of damaging effects of chemicals on the mucous membrane rabbit eyes., *Medicine Pracy*, XXIV, , vol.3, pp. 321-336
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*., vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63.
- Müller G., Kramer A. (2008) Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother.*, vol. 61, no. 6, pp. 1281-1287.
- Noda Y., Fujii K., Fujii S. (2009) Critical evaluation of cadexomer-iodine ointment and povidone-iodine sugar ointment. *Int J Pharm.*, vol. 8, no. 372 (1-2), pp.85-90.
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals (2013) Section 4: Health Effects. Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method. DOI: 10.1787/9789264203822-en.
- Rusanov A.L., Luzgina N.G., Lisitsa A.V. (2017) Sodium dodecyl sulfate cytotoxicity towards HaCaT keratinocytes: comparative analysis of methods for evaluation of cell viability. *Bull Exp Biol Med.*, vol. 163, no. 2, pp. 284-288.
- Russell W.M.S., Burch R.L. (1950) *The Principles of Humane Experimental Techniques*. Methuen and Co., London, UK, pp. 238.
- Taub M., Ue B., Chuman L., Rindler M.J., Saier M.H. (1981) *Supramolecule Structure*., vol. 15, pp. 63-72.
- Taub M., Ue B., Chuman L., Rindler M.J., Saier M.H. (1979) Alterations in growth requirements of kidney epithelial cells in defined medium associated with malignant transformation. *Methods Enzymol.*, vol. 58, pp. 552-560.

Tsurumaru D., Utsunomiya T., Matsuura S., Komori M., Kawanami S., Ishibashi T., Honda H. (2010) Gastric mucosal changes caused by Lugol's iodine solution spray: endoscopic features of 64 cases on screening esophagogastroduodenoscopy. *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2010, pp. 1-4.

Wilson S.L., Ahearne, M., Hopkinson, A. (2015) An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology* 327., pp. 32–46.

Wutzler P., Sauerbrei A., Klöcking R., Brögmann B., Reimer K. (2002) Virucidal activity and cytotoxicity of the liposomal formulation of povidone-iodine. *Antiviral Res.*, vol. 54., no. 2, pp. 89-97.

Yuldasheva G.A., Zhidomirov G.M., Abekova A.O., Ilin A.I. (2016) The Mechanism of Anti-Cancer Activity of Complexes of Molecular Iodine with α -Dextrins and Polypeptides and Lithium Halogenides. *Journal of Antivirals and Antiretrovirals.*, vol. 8, pp. 072-078. DOI:10.4172/jaa.1000138.

Zavyalov N.V., Chernovskaya G.P., Pankratova G.P. i dr. (1998) Uskorennoe izuchenie citotoksicheskogo deistviya v ekspresstestah in vitro. [Accelerated study the cytotoxic effect in rapid tests in vitro]. *Sb. Tezicov dokl. 1-go s'ezda toksikologov.*, Moskva., p. 279.

Trahtenberg I.M., Kovalenko V.M., Kokshar`ova N.V., Zhmin`ko P.G. (2008) Likars`ka toksikologiya: Alternativni metodi i test-sistemi. [Drug technology: Alternative methods and test-systems]. *AMN Ukraini I.M. Trahtenberga.*, p. 272.