

ВЛИЯНИЕ ЗАРЯДА АНИОНА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕТЕРОПОЛИКИСЛОТ КЕГГИНА

© 2020 г. О. А. Лопатина², И. А. Суетина², М. В. Мезенцева², Л. И. Руссу²,
С. А. Ковалевский¹, Е. М. Балашов¹, С. А. Уласевич³, А. И. Кулак³,
Д. А. Кулемин³, Н. М. Ивашкевич³, Ф. И. Далидчик^{1*}

¹Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия

²«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения РФ, Москва, Россия

³Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

*E-mail: domfdal@mail.ru

Поступила в редакцию 30.01.2019;

после доработки 12.02.2019;

принята в печать 20.02.2019

Методами МТТ и полимеразной цепной реакции изучены ингибирующая и иммуномодулирующая активности фосфорных и кремниевых гетерополикислот с анионами Кеггина $[XМ(1)_{12-n}М(2)_nO_{40}]^{-m}$, где $X = P, Si$; $M = Mo, W, V$; $m = 3, 4, 5$) в отношении клеток фибробластов эмбриона человека. Продемонстрирована и интерпретирована корреляция ингибирующей активности гетерополикислот с зарядами их анионов.

Ключевые слова: цитотоксичность, клетки фибробластов эмбриона человека, гетерополикислоты, антивирусная активность.

DOI: 10.31857/S0207401X20010070

ВВЕДЕНИЕ

Класс полиоксометаллатов (ПОМ), к которому относятся и гетерополикислоты (ГПК) с комплексообразующими атомами (P, Si, Al и др.) — неисчерпаемое множество наноразмерных структур, физические и химические свойства которых, в зависимости от состава и архитектуры, варьируются в широких пределах и допускают тонкую подборку [1, 2]. Давно известные как эффективные катализаторы, сегодня ПОМ активно изучаются как новые, возможно, наиболее перспективные наноматериалы XXI-го века [3]. Область известных и планируемых применений ПОМ охватывает все направления нанотехнологий, включая нанобиологию и наномедицину.

Открытия в 70–90-х годах высокой антивирусной, противоопухолевой и антибактериальной активности ПОМ [4] стимулировали интенсивные исследования, нацеленные на создание новых лекарственных препаратов, дешевых и эффективных, необходимых для борьбы со многими заболеваниями нашего времени и прежде всего с раком и СПИДом. На разных уровнях (*in vitro* и *in vivo*) к началу “нулевых” годов уже было продемонстрировано общее важное свойство ПОМ — способность этих препаратов эффективно подавлять ак-

тивность вирусов и разрушать патологические клетки. Одновременно стали ясны принципиальные недостатки ПОМ — высокая токсичность в отношении здоровых клеток и сложность в подборе ПОМ-соединения в каждом конкретном случае его применения как малотоксичного и, в то же время, эффективного лекарственного средства направленного терапевтического действия.

В последние десятилетия поиски малотоксичных, биологически активных ПОМ ориентируются в основном на многокомпонентные соединения, неорганические [5] или композитные, органико-неорганические [6]. Эти поиски подобны тем, что ранее велись для металлооксидов, свойства которых зависят от степени их совершенства, т.е. природы и количества различных точечных дефектов [7]. Известно, что все свойства ПОМ-соединений зависят от их молекулярных параметров и характеристик, таких как ионные размеры, форма, анионные заряды, редокс-потенциалы и др. Природа этих зависимостей, т.е. микроскопические механизмы физических и биохимических процессов, идущих при взаимодействиях ПОМ с клетками, нуждается в тщательном изучении. Цель настоящего сообщения — исследовать и объяснить возможный механизм влияния заряда

анионов ПОМ на их биологические свойства на примере взаимодействия ГПК Кеггина с клетками фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах, результаты которых приводятся ниже, были использованы стерильные водные сантимолярные растворы ГПК Кеггина ($H_3PW_{12}O_{40}$, $H_3PMo_{12}O_{40}$, $H_4SiW_{12}O_{40}$, $H_4SiMo_{12}O_{40}$) фирмы “Biochem” (Франция), а также их ванадий-замещенные аналоги (№ 1 – $H_4PMo_{11}VO_{40}$, № 2 – $H_5PMo_{10}V_2O_{40}$, № 3 – $H_4PMo_{11}VO_{40}^*$, синтезированные в Институте общей и неорганической химии НАН Беларуси. Тестирование биологических свойств (цитотоксичности и иммуномодулирующей активности) осуществляли на перевиваемых линиях клеток фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ), которые были получены из коллекции культур клеток “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” МЗ РФ. Во всех экспериментах клетки первоначально культивировали в течение 24 ч ($37^\circ C$, 5% CO_2) в питательных средах Игла ДМЕМ (“Биолог”, Санкт-Петербург, Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Gibco/Life Technologies, США). Исследовали влияние химического состава ГПК на жизнеспособность клеток ФЭЧ (их пролиферацию и гибель) и клеточный иммунитет.

Для качественной оценки цитотоксичности и визуализации процесса гибели клеток использовали метод прижизненной окраски клеточных материалов бромистым этидием, EtBr. Молекулы этого интеркалирующего агента способны проникать лишь в клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной. Проникая в объем, EtBr образует комплекс с ДНК, который флюоресцирует в красной области спектра, тем самым позволяя регистрировать погибшие клетки.

В экспериментах по изучению гибели клеток под действием ГПК использовали следующий протокол. В 6-луночную панель с покровным стеклом вносили культуральную среду (КС) с 10%-ной ЭТС, содержащей ФЭЧ в концентрации 200 тыс. клеток/мл. Спустя 24 ч после начала инкубации ($37^\circ C$, 5% CO_2) в лунки вносили водные растворы ГПК различных концентраций. Бромистый этидий, необходимый для оценки количества погибших клеток, вносили в лунки одновременно с ГПК в конечной концентрации 1 мкг/мл.

Для количественных оценок цитотоксичности ГПК применяли МТТ–тестирование [8]. Стандартный метод МТТ-теста основан на способности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ живых, метаболически активных клеток восстанавливать бесцветный водорастворимый

МТТ-реагент до голубого формазана, кристаллизующегося внутри клеток. Кристаллы формазана переводят в раствор с помощью органического растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) с последующей спектрофотометрией. Таким образом, восстановленный клетками МТТ-реагент является показателем жизнеспособности клеток в изучаемой культуре, что позволяет количественно оценить гибель клеток под воздействием тестируемой ГПК.

В наших экспериментах применяли следующий протокол. Зрелые клетки ФЭЧ переносили на 96-луночную панель фирмы “Costar” (США) в концентрации 200 тыс. клеток/мл в каждую лунку в объеме 100 мкл среды с 10%-ной ЭТС и помещали в CO_2 -инкубатор при $37^\circ C$. Через 24 ч после посадки клеток в лунки вносили по 100 мкл раствора изучаемого препарата в заданных разведениях. Контролем служили интактные клетки, культивируемые параллельно с опытными. После инкубации клеток в КС с выбранной ГПК культуральную среду отсасывали из лунок, добавляли по 100 мкл среды с 20 мкл МТТ (3[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2.5-дифенилтетразолия, “Sigma”) в исходной концентрации 5 мг/мл и инкубировали в течение 4 ч. Затем среду с МТТ удаляли и добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Осадок клеток ресуспендировали в течение 5 мин пипетированием. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора, измеряя оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 545 нм фотометра Immunochem 2100 (США). Каждую концентрацию выполняли в трех повторах. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения MS Excel, “Statistica 6.0”. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0.05$.

Вместе с цитотоксичностью в работе изучали также иммунный отклик клеток на действие ГПК. В работе [9] было показано, что, стимулируя экспрессию генов цитокинов, ГПК могут влиять на клеточный иммунитет. Оценка этого влияния важна для поисков оптимальных вариантов применения ПОМ-препаратов для лечения инфекционных и неврологических заболеваний. Для решения вопроса о возможной роли анионных зарядов мы поставили новые эксперименты с применением ванадий-замещенных ГПК с повышенными значениями анионных зарядов. Методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ–ПЦР) с использованием для детекции результатов маркера J1758 фирмы “Promega” (США) в этих экспериментах наблюдали ПОМ-стимулированную экспрессию генов

Таблица 1. Жизнеспособность клеток (% выживших клеток ФЭЧ после их инкубации с ГПК) в течение 1 ч (по данным МТТ-теста)

ГПК	Жизнеспособность клеток, %										
	5000*	2500*	1250*	625*	312*	156*	78*	39*	19.5*	9.8*	4.9*
$H_4PMo_{11}VO_{40}$	67 ± 1.0	74 ± 2.6	89 ± 3.5	97 ± 2.0	99 ± 1.1	95 ± 1.0	99 ± 1.5	98 ± 1.9	97 ± 1.0	96 ± 3.0	105 ± 1.3
$H_5PMo_{10}V_2O_{40}$	61 ± 0.9	80 ± 2.0	90 ± 1.4	95 ± 2.0	95 ± 2.0	99 ± 0.7	98 ± 1.0	101 ± 1.0	104 ± 3.0	105 ± 1.0	106 ± 1.0
$H_4PW_{11}VO_{40}$	80 ± 4.0	88 ± 1.0	88 ± 2.0	89 ± 2.0	94 ± 3.0	90 ± 4.0	94 ± 3.0	93 ± 2.0	92 ± 3.0	106 ± 5.0	109 ± 1.0
$H_4SiMo_{12}O_{40}$	97 ± 1.0	100 ± 2.0	100 ± 3.0	99 ± 2.0	105 ± 3.0	103 ± 3.0	101 ± 3.0	97 ± 2.0	98 ± 2.0	100 ± 1.0	112 ± 2.0

* Концентрация ГПК, мкМ (здесь и в табл. 2).

Таблица 2. Жизнеспособность клеток ФЭЧ по данным МТТ-теста (% выживших после инкубации в растворах ГПК в течение 48 ч)

ГПК	Жизнеспособность клеток, %										
	5000	2500	1250	625	312	156	78	39	19.5	9.8	4.9
$H_4PMo_{11}VO_{40}$	0	0	33 ± 4	30 ± 1	29 ± 3	43 ± 1	62 ± 2	82 ± 3	90 ± 4	109 ± 4	120 ± 11
$H_5PMo_{10}V_2O_{40}$	0	0	21 ± 1	21 ± 1	20 ± 1	34 ± 1	57 ± 2	59 ± 4	88 ± 4	91 ± 8	104 ± 1
$H_4PW_{11}VO_{40}$	0	34 ± 3	30 ± 2	40 ± 1	68 ± 1	72 ± 4	95 ± 5	95 ± 1	101 ± 1	110 ± 2	120 ± 4

интерлейкинов, фактора некроза опухолей и интерферонов. Полученные результаты (в сравнении с известными для других ГПК [9]) приводятся в табл. 1 и 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценивая всю совокупность результатов, приведенных на рис. 1 и в табл. 1–4, можно прийти к выводу о весьма сильной зависимости цитотоксичности ГПК от анионного заряда, m (см. табл. 1 и 2, которые наглядно демонстрируют, что с ростом m токсичность быстро увеличивается). Из данных табл. 3 и 4 следует вывод о слабой, в наших экспериментах не выявленной, зарядовой зависимости иммуномодулирующей активности тестируемых соединений (см. табл. 3 и 4). Иммуномодулирующие свойства ГПК, в отличие от их токсичности, оказываются зависящими от элементного состава этих соединений. К такому выводу можно прийти, сравнивая данные, приведенные в табл. 3 и 4.

Оценивая цитотоксичность ГПК в целом, видно, что умеренно токсичная кремнемолибденовая кислота ($m = 4$) оказывает заметное воздействие на клетки. Из рис. 1в, видно, что уже спустя 2 ч после сокультивирования клеток ФЭЧ в питательном растворе, содержащем $H_4SiMo_{12}O_{40}$, в ансамбле клеток происходит лизис, свидетельствующий об их полной гибели. (Первые признаки

токсического воздействия $H_4SiMo_{12}O_{40}$ — единичные повреждения клеточных ДНК — становятся заметными спустя 10–20 мин после начала действия этой кислоты (см. рис. 1б)).

Обсудим теперь природу обнаруженной зарядовой зависимости цитотоксичности ГПК по отношению к клеткам ФЭЧ. Согласно современным представлениям воздействие ПОМ на живые клетки может быть связано с локальными нарушениями функциональных возможностей различных клеточных структур, которые оказываются в роли поражаемых биологических мишеней (в качестве примера см. рис. 13 из работы [10]).

Во многих случаях цитотоксичность препаратов, например, цисплатина [11], находит объяснение в предположении об образовании этими препаратами связанных с ДНК достаточно прочных комплексов. Последние сшивают звенья ДНК и затрудняют (или исключают) акты репликации, что неизбежно приводит к гибели клетки. Ясно, что с ростом заряда аниона прочность ДНК–ГПК комплексов и, соответственно, эффективность механизма “сшивки”, должны возрастать, что и наблюдается на опыте (см. табл. 1 и 2). Это также следует из результатов работы [12], в которой изучался механизм воздействия на раковые клетки ванадий-содержащих солей ГПК Кеггина. Среди последних максимально эффективными оказались соединения с наибольшими зарядами анионов.

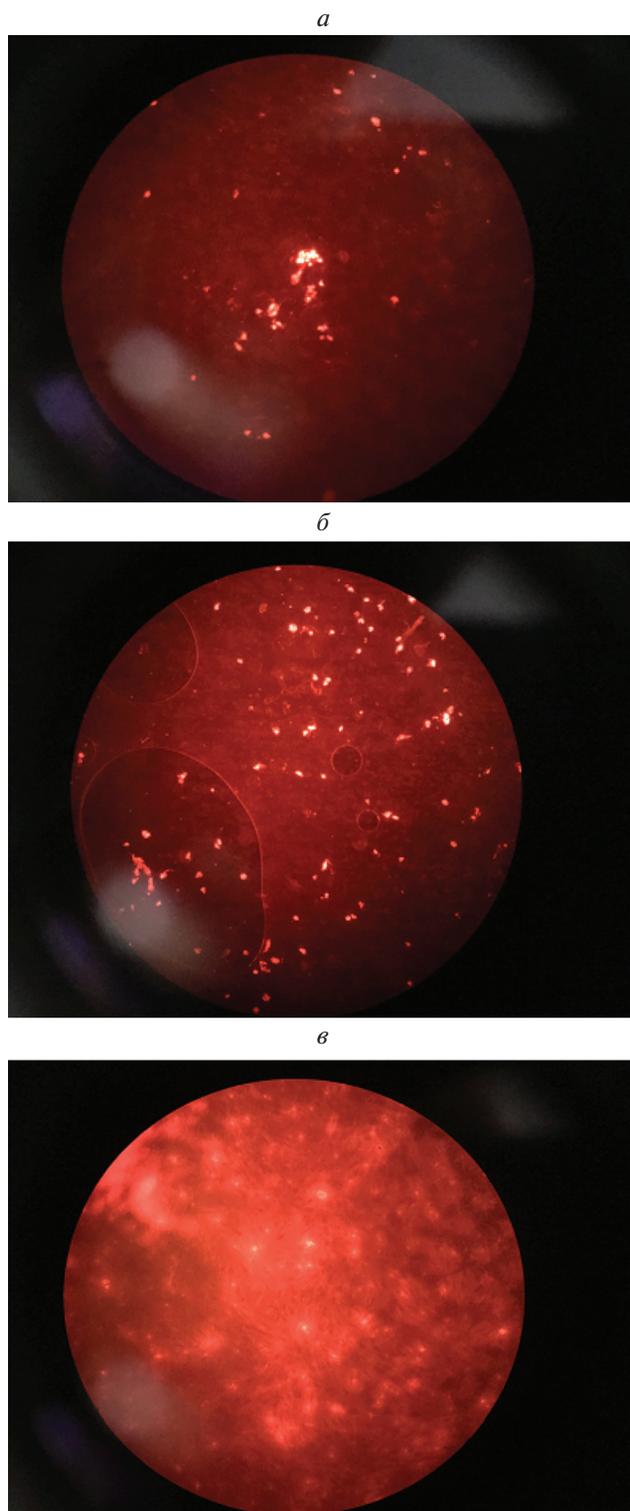


Рис. 1. Флуоресценция поврежденных клеток ФЭЧ после их инкубации с ГПК $\text{H}_4\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}$: *а* – через 20 мин, *б* – через 40 мин, *в* – через 1 ч.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отметим в заключение, что процесс взаимодействия многозарядного аниона с ДНК, возможно, основной, но не единственный этап в це-

почке физико-химических, зарядово-зависимых процессов, которыми определяется цитотоксичность ПОМ. Можно указать, по крайней мере, еще два процесса, каждый из которых тем более

Таблица 3. Экспрессия генов цитокинов в клетках ФЭЧ под действием ПОМ

ПОМ	Наличие (+)/отсутствие(-) мРНК цитокинов в клетках ФЭЧ								
	ИФН- α	ИФН- β	ИФН- γ	ИФН- λ	ИЛ-1 β	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-18	ФНО- α
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H ₄ SiW ₁₂ O ₄₀	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H ₄ SiMo ₁₂ O ₄₀	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Контроль клеток без ПОМ	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Таблица 4. Обнаружение (+) или отсутствие (-) экспрессии генов цитокинов в клетках ФЭЧ под действием ванадий-содержащих ПОМ

ПОМ	Наличие (+)/отсутствие (-) мРНК цитокинов в клетках ФЭЧ							
	ИФН- α	ИФН- β	ИФН- γ	ИФН- λ	ИЛ-1 β	ИЛ-8	ИЛ-6	ИЛ-18
H ₄ PMo ₁₁ VO ₄₀	+	+	-	-	-	-	+	+
H ₅ PMo ₁₀ V ₂ O ₄₀	+	+	-	-	-	-	+	+
H ₅ PMo ₁₀ V ₂ O ₄₀	+	+	-	-	-	-	+	+
H ₄ PW ₁₁ VO ₄₀	+	+	-	-	-	-	+	+
Контроль клеток без ПОМ	+	+	-	-	-	-	+	+

вероятен, чем больше анионный заряд. Первый – прохождение анионом мембраны клетки, чья скорость зависит от заряда и повышается с его увеличением (см. работу [13]). Второй – этап перемещения высокозарядного аниона от места прохождения мембраны до ДНК, вероятность которого зависит от гидролитической стабильности аниона [14], которая зависит от валентности гетероатома, влияющей на анионный заряд.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме “Фундаментальные основы создания наноструктурированных систем нового поколения с уникальными эксплуатационными электрическими и магнитными свойствами” № 0082-2018-0003 (рег. номер АААА-А18-118012390045-2) и при финансовой поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-54-00004 Бел_а) и Белорусским фондом фундаментальных исследований (договор № X18P-110).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поп М.С. Гетерополи- и изополиметаллы. / Пер. с англ. Новосибирск: Наука, 1990.
2. Далидчик Ф.И., Балашов Е.М., Буданов Б.А. // Хим. физика. 2010. Т. 29. № 11. С. 21.
3. Pope M.T. Polyoxometalates / Encyclopedia of Inorganic & Bioinorganic Chemistry. 1st ed. Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2011.
4. Hasenknopf B. // Front. Biosci. 2005. V. 10. P. 275.
5. Haapala D.K., Jasmin C., Sinoussi F. et al. // Biomedicine. 1973. V. 19. № 1. P. 7.
6. Dolbecq A., Dumas E., Mayer C.R. et al. // Chem. Rev. 2010. V. 98. P. 6009.
7. Далидчик Ф.И., Балашов Е.М., Шуб Б.Р. // Хим. физика. 2008. Т. 27. № 12. С. 10.
8. Подчерняева Р.Я., Суетина И.А., Михайлова Г.Р. и др. // Вопр. вирусологии. 2012. Т. 57(5). С. 46.
9. Лопатина О.А., Исаева Е.И., Суетина И.А. и др. // Наноматериалы и наноструктуры – XXI век. 2016. Т. 7. № 1. С. 36.
10. Bijelic A., Aureliano M., Rompel A. // Angew. Chem. Intern. Ed.; <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>
11. Rosenberg B., Vancamp L., Krigas T. // Nature. 1965. V. 205(4972). P. 698.
12. Qi W., Zhang B., Qi Y. et al. // Molecules. 2017. V. 22. № 9. P. 1535; <https://doi.org/10.3390/molecules22091535>
13. Li-Tang Yan L.-T., Yu X. // ACS Nano. 2009. V. 3. № 8. P. 2171.
14. Ковалевский С.А., Лопатина О.А., Далидчик Ф.И. и др. // Рос. нанотехнол. 2018. Т. 13. № 7–8. С. 51.