

# Изучение безопасности молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов, предназначенных для адресной доставки лекарственных веществ

Остроушко АА, д.х.н.; Данилова ИГ, д.б.н.; Медведева С.Ю, к.м.н.; Гетте ИФ, к.б.н.; Тонкушина М.О. Уральский государственный университет им. А.М.Горького (Научно-исследовательский институт физики и прикладной математики), Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, лаборатория морфологии и биохимии, г. Екатеринбург

## Studying of safety of molybden nanocluster polyoxometalates intended for address delivery of medicinal substances

Ostroushko A.A., Danilova I.G., Medvedeva S.J., Gette I.F., Tonkushina M.O.

### Резюме

Химическая структура бубкиболов на основе полиоксометаллатов определяет возможность их использования в качестве наноконтейнеров для переноса лекарственных средств в поврежденные ткани. Проведено исследование устойчивости бубкиболов на основе молибдена в жидкостях с различными рН, а также изучение их токсичности и кумулятивности при введении в организм. Обнаружено, что бубкиболы на основе молибдена обладают низкой кумулятивностью и высокой токсичностью по отношению к гепатоцитам, что проявляется в увеличении индекса альтерации последних, повреждении микроциркуляторного русла печени.

**Ключевые слова:** бубкиболы, полиоксометаллаты, наноконтейнеры, токсичность

### Summary

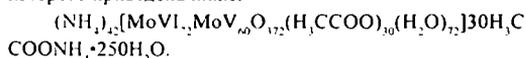
The chemical structure of buckyballs on a basis of polyoxometalates defines possibility of their use in quality nanocarriers for carrying over of medical products to the damaged fabrics. Buckyballs on the basis of molybdenum stability research is carried out in liquids with various pH, and also studying of their toxicity and accumulation after introduction in an organism. It is revealed that buckyballs on the basis of molybdenum possess low accumulation and high toxicity in relation to hepatocytes that is shown increase in an index of alteration of the last, damage microcirculation liver channels.

**Keywords:** buckyballs, polyoxometalates, nanocarriers, toxicity

### Введение

Современная фундаментальная и прикладная наука возлагает большие надежды на возможность создания на основе нанокластерных соединений средств адресной доставки лекарственных веществ и локального воздействия на очаги поражения в организме [1,2,3]. В частности, имеется большая группа соединений, объединяемых названием полиоксометаллаты (ПОМ) [4,5]. Основа этих веществ образована координационными кислородными полиэдрами многозарядных ионов переходных металлов, таких как молибден, вольфрам, ванадий. Имеются данные о противоопухолевой, антибактериальной и противовирусной активности ПОМ на основе молибдена [6,7].

Около 10 лет назад, благодаря работам научной школы под руководством профессора А.Мюллера [5], стала известной новая группа полиоксометаллатов со структурой бубкиболов (фуллеренов). В растворах они образуют многозарядные полнанионы, способные к достаточно активному транспорту под действием электрического поля [8]. Неорганические бубкиболы размером около 2, 5 нм имеют внутренние полости и окна, через которые возможен обмен небольшими молекулами с окружающей средой [4]. Одним из наиболее типичных представителей бубкиболов является полиоксометаллат Mo132, формула которого приведена ниже:



В биологических системах молибден, не являющийся компонентом бубкиболов, образует связи с кислородом карбоксильных и гидроксильных групп (например, с остатками тирозина и серина в белках), возможно также комплексообразование с участием сульфгидрильных групп [9]. Указанные особенности молибдена обуслов-

Ответственный за ведение переписки -  
Данилова Ирина Георгиевна  
620066 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106  
i.g.danilova@mail.ru

ливают его участие в качестве кофактора оксидаз, содержащих флавиновые коферменты – гипоксантиноксидазы, ксантиноксидазы, альдегидоксидазы. В ходе ферментативной реакции, катализируемой ксантиноксидазой, молибден в  $MoO_{22+}$  последовательно восстанавливается от степени окисления +6 до +5, затем до +4. Флавины, молибден-зависимые ферменты часто связаны в пары и участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, включающих перенос от одного до четырех электронов. Следовательно, увеличение транспорта электронов в этих цепочках при избытке молибдена должно сопровождаться усиленным образованием активных форм кислорода. В реакциях окисления пуриновых оснований, катализируемых гипоксантиноксидазой и ксантиноксидазой, выделяется пероксид водорода, и в качестве конечного продукта образуется мочевая кислота, которая может быть причиной поражения суставов и мочекаменной болезни. Известно, что у жителей, проживающих в области с избытком молибдена (Армянское нагорье), возникают гиперурикемия и подагра [10].

В организм человека и млекопитающих молибден поступает с пищей, его растворимые соединения легко всасываются в кишечнике, суточная потребность для человека составляет 0,15 – 0,5 мг [9,10]. Особенностью обмена молибдена считается отсутствие его накопления в организме млекопитающих и выведение преимущественно с мочой.

Обмен молибденовых букиболов может иметь отличия от обмена обычных соединений молибдена в организме вследствие уникальных особенностей наночастиц. Известно, что в наноразмерном состоянии частицы приобретают физико-химические свойства, которые часто радикально отличаются от свойств этих же веществ в форме сплошных фаз или низкомолекулярных соединений [11,12]. Уникальные свойства наночастиц, позволяющие использовать их в медицинских целях, в то же время могут быть причиной их токсичности, обусловленной следующими механизмами: проникновение через мембраны, накопление в клетках, связывание с ДНК и белками, отсутствие распознавания и, следовательно, биотрансформации и иммунной реакции, увеличение продукции активных форм кислорода [13].

**Цель работы:** исследование устойчивости и токсичности букиболов на основе молибдена, предназначенных в качестве контейнеров или ядер для переноса лекарственных веществ.

## Материалы и методы

Синтез  $Mo^{132}$  осуществляли по методике, опубликованной в работе [4]. Исходными реагентами служили гептамолибдат аммония  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  квалификации «хч», гидразин сернокислый  $N_2H_4 \cdot H_2SO_4$  и гидроксид натрия  $NaOH$  квалификации «ч.д.а.», хлорид аммония  $NH_4Cl$  квалификации «осч». Полученное соединение аттестовали с точки зрения состава, структуры, чистоты от примесей рядом независимых физико-химических методов: спектрофотометрии, спектроскопии ИК, ЯМР, ЭПР, рентгенографического анализа. Из-

мерение pH среды проводили с помощью pH-метра – номера П-130.2М.

Кумулятивность букиболов исследовали в ходе эксперимента на беспородных крысах обоего пола массой 200-230 г, содержащихся на обычном рационе вивария. Введение букиболов осуществлялось в виде инъекции в область икроножной мышцы в концентрации 10-2 моль/л (в пересчете на  $MoO_4$ ) ежедневно в течение месяца, доза вводимого букибола соответствовала верхней границе нормы суточного потребления молибдена. Контролем служили интактные животные. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфира. Содержание молибдена в костях и внутренних органах определяли на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой iCAP-6500 Duo (Thermo Scientific).

Подготовку образцов тканей печени и почек для гистологического исследования осуществляли на автоматическом процессоре Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и Вейгерту. Микроскопическое исследование производили на микроскопе Leica DM 2500, анализ изображений выполняли в программе ВидеоТест «Морфология» 5.0. Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью цифровой цветной видеокамеры «CAM 2800». На гистологических препаратах подсчитывали: количество гепатоцитов и двуядерных клеток (пролиферативную активность) на одно поле зрения ( $S=0,01 \text{ мм}^2$ ); индекс альтерации; количество синусоидальных клеток.

Анализ периферической крови проводили на автоматизированном гематологическом анализаторе Celly 70 Biocode Hysel.

Статистический анализ материала проводили с помощью программ Statistica 6.0 (Stat .Soft.Inc.) и программы Microsoft Excel 2003. В таблицах отражены средние величины значений, а также стандартная ошибка среднего. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test). При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ( $P < 0,05$ ).

## Результаты и обсуждение

На первом этапе работы был установлен возможный способ введения букиболов на основе молибдена в организм. Существует несколько способов введения букиболов: пероральный, то есть внедрение букиболов непосредственно в желудок или в капсуле в кишечник (pH желудка 1,5-2,5; pH кишечника 7,8 - 8,0), и парентеральный - внутримышечный (pH клетки 7,2), внутривенный (pH крови  $7,4 \pm 0,04$ ).

С помощью спектрофотометрических методов была получена диаграмма зависимости устойчивости букибола от pH среды (рис. 1. - *этот и прочие рисунки статьи см. на специальной вкладке*).

Установлено, что букибол распадается при  $pH < 2$  и при  $pH > 7$ . При низких концентрациях букибол также распадается, а при высоких необратимо кристаллизуется.

Таким образом, наиболее благоприятной областью устойчивости молибденовых бункиболов при необходимой концентрации является рН=7, следовательно, лучший способ введения раствора бункиболов в организм - это внутримышечный.

При исследовании содержания молибдена в органах крыс опытной группы не было выявлено накопления этого элемента в печени и костях (рис. 2).

Для почек же обнаружено резкое снижение его содержания. Отсутствие аккумуляции молибдена может быть связано с тем, что в организме происходила диссоциация бункиболов на более простые формы, которые легко выводятся из организма.

При гистологическом анализе срезов почек опытной группы животных структурных изменений в клубочках не обнаружено (рис. 3).

В просвете канальцев определялись эозинофильные массы. Данные изменения носили очаговый характер. Также определялось очаговое полнокровие синусоидальных сосудов с образованием «сладж-комплекса» (рис. 4).

Изменения в просвете почечных канальцев, вероятно, связаны с выведением соединений молибдена преимущественно путем усиленной секреции. Наличие эозинофильных масс и полнокровие сосудов свидетельствуют о сенсбилизации и воспалительном процессе в области почечных канальцев - месте их временного концен-

трирования при выведении.

При гистологическом исследовании печени опытной группы животных отмечали диффузное полнокровие центральных вен и очаговое полнокровие вен портальных трактов. В паренхиме органа отмечали очаговое полнокровие синусоидов с образованием «сладж-комплекса» (рис. 5).

В части перипортальных трактов определяется перипортальная лейкоцитарная инфильтрация (рис. 6). Визуально отмечается повышение числа Купферовых клеток в синусоидах. Часть гепатоцитов имеет признаки зернистой дистрофии. При определении индекса альтерации установлено, что у животных опытной группы индекс возрастает по сравнению с интактными крысами в среднем в 1,3 раз, что подтверждает данные морфологического анализа о токсическом воздействии бункиболов на основе молибдена (рис. 6, таблица 1).

Процессы альтерации сопровождаются активацией внутриклеточной регенерации органа, поскольку количество двуядерных клеток в печени опытной группы животных увеличивается (таблица 1). Возможно, это связано с возрастанием активности и количества синусоидальных клеток в печени. Синусоидальные клетки (клетки Купфера, клетки Ито) выделяют факторы роста, цитокины, способствующие регенерации.

Полнокровие кровеносных сосудов, образование

**Таблица 1. Изменение индекса альтерации, пролиферативной активности гепатоцитов и числа синусоидальных клеток печени крыс при введении бункиболов**

Количество клеток на одно поле зрения S=0,01 мм <sup>2</sup>	Интактная группа	Опытная группа
Поврежденные гепатоциты	17,1±0,1	220,2±1,6*
Двуядерные гепатоциты	14,55±0,01	23,25±0,12*
Синусоидальные клетки	140,1±1,2	217,1±1,6*

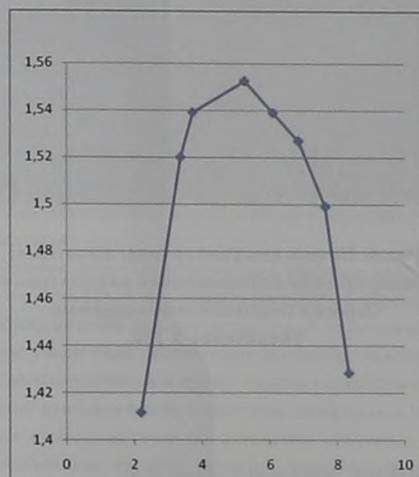
*Примечание \* - различие с группой интактных животных достоверно при P < 0,05*

**Таблица 2. Показатели периферической крови крыс при введении бункиболов**

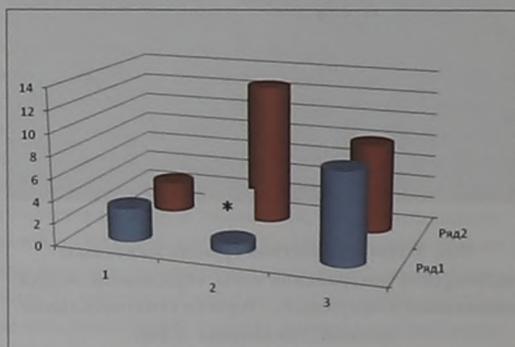
Показатель	Интактные	Опытная группа
Гематокрит, %	36,8 ± 0,6	39,8 ± 1,7
Гемоглобин, г/л	129,8 ± 3,3	128,5 ± 4,5
Эритроциты, Т/л	6,85 ± 0,16	7,30 ± 0,18
Средний объем эритроцитов, фл	53,7 ± 0,6	54,4 ± 1,2
Содержание гемоглобина в эритроците, пг	19,0 ± 0,4	17,9 ± 0,4
Концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	35,3 ± 9,6	32,3 ± 0,4
Лейкоциты, г/л	13,0 ± 0,6	12,3 ± 1,06
Лимфоциты, г/л	8,95 ± 1,00	7,88 ± 0,82
Лимфоциты, %	68,4 ± 6,5	63,5 ± 2,3 *
Моноциты, г/л	2,00 ± 0,50	1,32 ± 0,15
Моноциты, %	16,0 ± 4,1	11,0 ± 0,9 *
Гранулоциты, г/л	2,0 ± 0,3	3,1 ± 0,2 *
Гранулоциты, %	15,6 ± 2,5	25,5 ± 1,6 *
Тромбоциты, г/л	329 ± 56	760 ± 105*

*Примечание \* - различие с группой интактных животных достоверно при P < 0,05*

**Изучение безопасности молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов, предназначенных  
для адресной доставки лекарственных веществ**

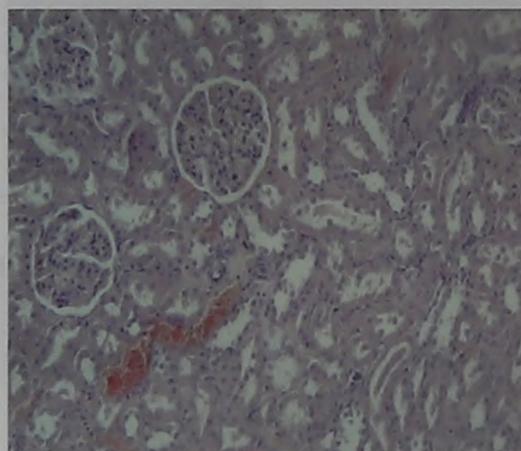


**Рис. 1.** Зависимость оптической плотности молибденовых бубиолов от pH среды (по оси абсцисс – pH, по оси ординат – оптическая плотность)

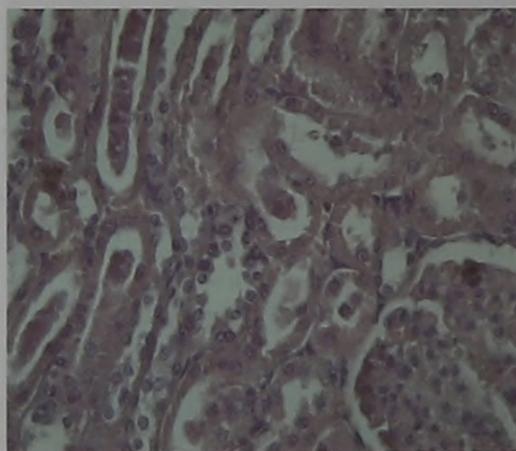


**Рис. 2.** Содержание молибдена в костной ткани (1), почках (2) и печени (3) intactных и опытных крыс, синий - опытные животные, красный – intactные.

*Примечание \* - различие с группой intactных животных достоверно при  $P < 0,05$ .*



**Рис. 3.** Почки животных опытной группы: в просвете канальцев эозинофильные массы. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение x 200



**Рис. 4.** Почки животных опытной группы: очаговое полнокровие синусоидных сосудов. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение x 200

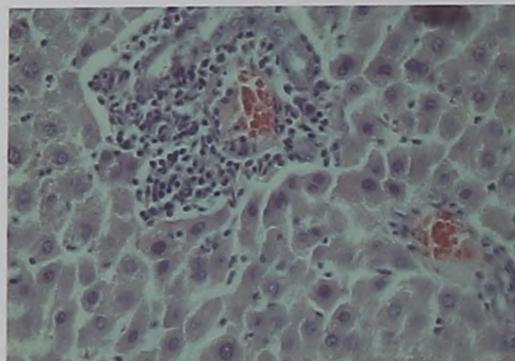


Рис. 5. Печень опытной группы животных: полнокровие центральной вены, образование «сладж-комплекса» в синусоидах. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение x 400.

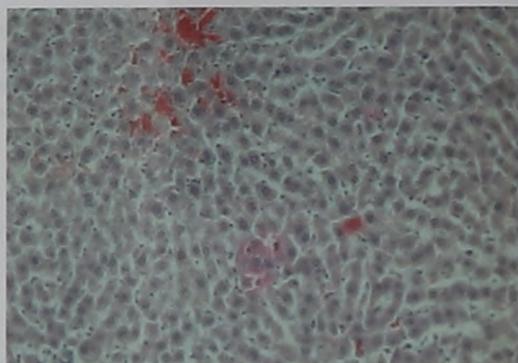


Рис. 6. Печень опытной группы животных: перипортальная лейкоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение x 200.

Медведева С.Ю., Данилова И.Г. Юшков Б.Г., Сенцов В.Г., Абидов М.Т., Гетте И.Ф.  
Роль макрофагов в патогенезе токсического гепатита у крыс

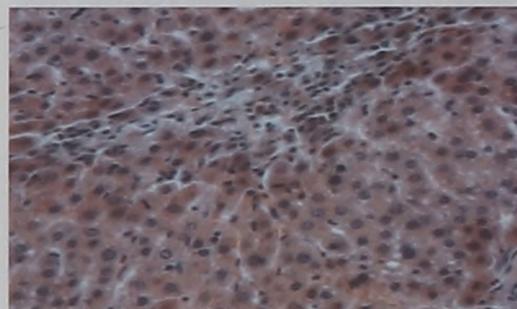


Рис.1. Токсический гепатит, вызванный введением тетрахлорметана, 3 сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200.

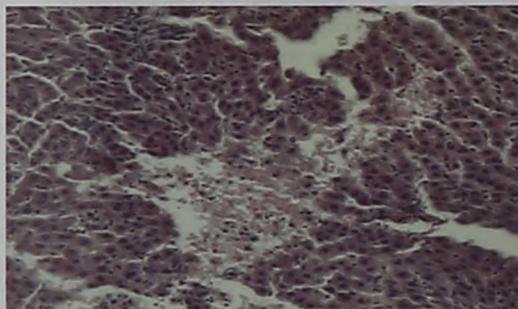


Рис. 2. Токсический гепатит, вызванный введением тетрахлорметана, 7 сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200.

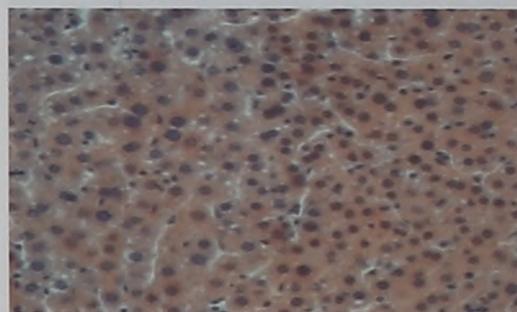


Рис. 3. Токсический гепатит, вызванный введением тетрахлорметана на фоне введения препарата «Тамерит», 3 сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200.

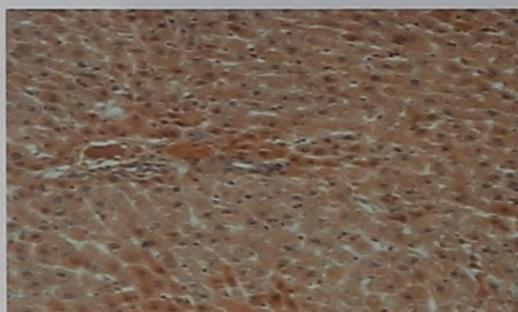


Рис. 4. Токсический гепатит, вызванный введением тетрахлорметана на фоне введения препарата «Тамерит», 7 сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200

сладж-комплексов и лейкоцитарная инфильтрация являются признаками воспалительного процесса в печени, возникающего, вероятно, вследствие повреждения части гепатоцитов. Одновременно компенсаторно усиливаются процессы регенерации в печени, что подтверждается увеличением количества двоядерных гепатоцитов, а также Купферовых и синусоидальных клеток, участвующих в регуляции регенерации.

Анализ показателей периферической крови животных (таблица 2) позволяет сделать вывод об отсутствии анемии в группе животных, получавших инъекции буккиболов, поскольку не обнаружено достоверного отличия количества эритроцитов, гемоглобина, содержания и концентрации гемоглобина в эритроцитах у опытных и интактных крыс.

Общее количество лейкоцитов у опытных животных также не возрастало, что свидетельствует об отсутствии системного воспалительного процесса. В то же время небольшое увеличение абсолютного и относительного количества гранулоцитов в крови опытных животных при снижении относительного количества лимфоцитов и моноцитов свидетельствует об изменении состояния иммунной системы, которое, вероятно, связано с местными воспалительными процессами в исследованных органах, обнаруженными морфологическими методами. Значительно возрастает количество тромбоцитов в периферической крови опытных животных, что может являться причиной образования сладж-комплексов в кровеносных сосудах печени и почек.

Поскольку не происходила кумуляция молибдена в исследованных органах, обнаруженные изменения в органах и периферической крови животных опытной группы могли быть следствием вызванных или усиленных соединений молибдена процессов: ускоренным образованием уратов и осаждением их в почечных канальцах,

усилением свободнорадикального окисления, реакцией иммунной системы (очаговые воспалительные процессы).

Токсическое действие вводимого препарата может быть обусловлено наличием в буккиболах молибдена в степени окисления  $5^+$ , причины токсичности которого обсуждаются в литературе. Отмечено [6], что соединения молибдена(VI), использованные для химиотерапии, образуют в организме молибден (V). Молибден (V) может участвовать в повторяющейся окислительно-восстановительной реакции с высвобождением электрона и последующим образованием активных форм кислорода, а также запускать апоптоз. В этом плане представляется важным в дальнейшем проведение исследований по адресной доставке буккиболов к очагу поражения, например, при помощи электрофореза, чтобы уменьшить их токсическое действие в целом организме. Кроме того, представляет большой интерес изучение воздействия на организм других буккиболов, не содержащих молибден (V).

## Выводы

1. Область приемлемой устойчивости молибденового буккибола находится в пределах значений  $pH=7$ , что определяет единственно возможный путь введения в организм – внутримышечный.

2. В печени воздействие буккиболов вызывает очаговые повреждения гепатоцитов, сопровождающиеся местными процессами воспаления и компенсаторной регенерацией в паренхиме. В почках воспалительные процессы локализуются в канальцах.

3. Отсутствие избирательной кумулятивности буккиболов в исследуемых тканях не обнаружено, что позволяет предположить обратимость выявленных изменений. ■

## Литература:

1. Euliss L.E., DuPont J.A., Gratton S., DeSimone J. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine. *Chem Soc Rev* 2006; 35 (11): 109-104.
2. Caruthers S.D., Wickline S.A., Lanza G.M. Nanotechnological applications in medicine. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18 (1): 26-30.
3. Dutta R.C. Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress. *Curr Pharm Des* 2007; 13 (7) 76-9.
4. Myller A., Krickemeyer E., Bugge H., Schidtmann M., Peters F. Organizational forms of matter: an inorganic superfullerene and keplerate based on molybdenum oxide. *Angew Chem Int* 1998; 37 (24): 3360-3.
5. Остроушко А.А., Могильников Ю.В., Попов К.А. Изучение полимерно-солевых композиций, содержащих анионные формы d-металлов. *ЖХХ* 1998; (44): 923-9.
6. Yamase T. Polyoxometalates for molecular devices: antitumor activity and luminescence. *Mol Eng* 1993; 3: 241-62.
7. Yamase T. Antitumoral and antiviral polyoxometalates (inorganic discrete polymer of metal oxide). *CRC Press* 1996; 365-73.
8. Остроушко А.А., Тонкушина М.О., Мартынова Н.А. Особенности влений массо- и электропереноса в системах, содержащих нанокластерные полноксометаллаты молибдена со структурой фуллерена. *Жур. физ. химии* 2-10; 6 (84): 1135-40.
9. Чист ков Ю.В. Основы бионеорганической химии. М: Хими – КолосС; 2007.
10. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Патифизиологи .Т.2. Основы патохимии. Санкт-Петербург: Элиби-СПб; 2001.
11. Захарченко В. Н. Коллоидна хими : Учеб. дл дл медико-биолог. спец. вузов.-2-е изд., перераб. и доп. М.: Высшшк.; 1989.
12. Schultz S., Smith D., Mock J. and Schultz D. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *PNAS* 2000; 97 (3): 996-1001.
13. Prabhu B.M., Ali S.F., Murdock R.C., Hussain S.M., Srivatsan M. Copper nanoparticles exert size and concentration dependent toxicity on somatosensory neurons of rat. *Nanotoxicology* 2010; 4(2):150-60