

## БИОХИМИЯ

УДК 615.218 + 615.856

А. Ф. Мирзоян<sup>1</sup>, З. А. Караян<sup>2</sup>, Ф. В. Мирзоян<sup>3</sup>, П. А. Казарян<sup>4</sup>

### Механизм действия препарата из класса полиоксиметаллатов на распределение ядер клеток по классам плоидности

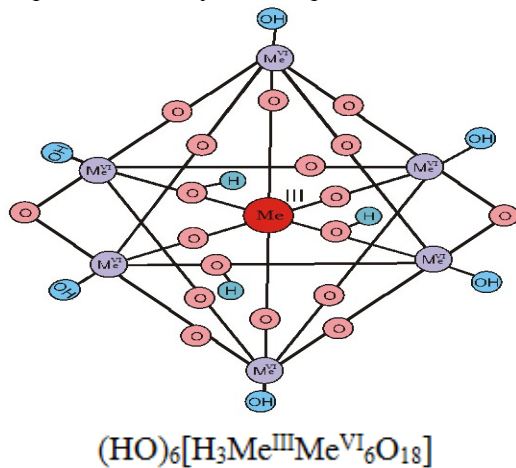
(Представлено чл.-кор. НАН РА Ж. И. Акопяном 23/ IV 2012)

**Ключевые слова:** полиоксиметаллат, трехвалентный металл, шестивалентный металл, ДНК, плоидность

На современном этапе развития медицины в ряду актуальных проблем одним из важных направлений является металлотерапия, связанная с открытиями в области неорганической химии. Доказано, что полиоксиметаллаты с гидроксо-функциональными группами, содержащие  $W^{VI}$ ,  $Mo^{VI}$ ,  $V^V$  и другие элементы, обладают противовирусными, антибактериальными и противоопухолевыми свойствами [1-6]. Важно отметить, что в условиях *in vitro* и *in vivo* экспериментально доказана определенная активность полиоксиметаллатов особенно по отношению к РНК содержащим вирусам. В настоящее время по этим направлениям имеется большое число публикаций зарубежных исследователей разных стран (Франция, Япония, США, Бельгия и др.), и это число все время возрастает. Эти публикации нами обобщены в [7]. Трудности, возникающие при использовании полиоксиметаллатов, связаны с не до конца выявленными строениями самих полиоксиметаллатов, что отмечают многие исследователи [8-10]. Полиоксиметаллаты в основном использованы в виде малорастворимых в воде конгломератов переменного состава, в которых число функциональных гидроксогрупп безусловно снижено за счет их участия в реакциях поликонденсации при образовании конгломератных форм. Вследствие поликонденсации и образования конгломератов молярные массы последних резко возрастают, что меняет свойства полиоксиметаллатов, например, они становятся малорастворимыми в воде. Все это, естественно, меняет и их биологическую активность. Возможно, и по этой причине

рекомендованные дозы примененных полиоксиметаллатов достаточно высоки – до 300 мг/кг [11,12], а иногда даже 500 мг/кг [9,13].

Исследования химии полиоксиметаллатов начиная с 1980 г. проводятся и в Армении (ИОНХ НАН РА, Ереван). В отличие от зарубежных школ, синтез и свойства различных полиоксиметаллатов изучались при их весьма малых концентрациях в водных растворах ( $n10^{-5}$ - $n10^{-7}$  моль/л), т.е. в условиях, когда они находятся в мономерном состоянии. Поскольку непосредственно такое изучение полиоксиметаллатов невозможно из-за низкого их светопоглощения, в качестве ключа впервые использованы избирательные реакции полиоксиметаллатов с основными красителями. Светопоглощение последних высоко, а окраска образующихся с ними комплексных ассоциатов с полиоксиметаллатами мультиплетно возрастает с ростом числа связанных в ассоциатах катионов красителей. Этот подход позволил получить беспрецедентные данные о составе комплексных ассоциатов полиоксиметаллатов и предложить новый подход к химизму образования полиоксиметаллатов в разбавленных водных растворах – предвидеть их «ядерное» строение [14]. Препарат под условным названием «вомифал» по существу является водным раствором ядра  $\beta$ -полиоксиметаллатов трехвалентного элемента в октоэдрическом окружении шестивалентного металла. В рамках наших представлений [14] этому полиоксиметаллату следует приписать следующее строение:



Этот состав полиоксиметаллата полностью подтверждается результатами изучения условий его получения, химических свойств и элементного состава методами физико-химического и препаративного анализа.

Полиоксиметаллат указанного состава является новой уникальной формой, которая как по химическому составу, так и по форме ранее не описана. В отличие от использованных ранее твердых полиоксиметаллатов, являющихся по существу неорганическими полимерами, этот полиоксиметаллат синтезируется непосредственно в водном растворе в виде новой молекулярной («ядерной») формы в мономерном состоянии, которая в растворе весьма устойчива длительное время (вот уже более двух

лет), не подвергаясь поликонденсации и не образуя малорастворимых в воде конгломератных форм. Все это позволяет предполагать, что этой форме присуща более низкая молекулярная масса и следовательно ее подвижность в водных растворах более высокая. Мы считаем, что указанные особенности, в сочетании с наличием большого числа функциональных гидроксогрупп, должны способствовать повышению у вомифала присущей полиоксиметаллатам биологической активности. Установлено, что препарат обладает рядом преимуществ в отношении фармакологических характеристик. Так, хранение вомифала в течение 18 месяцев при температуре 4-8 °С не влияет на его противовирусную активность. Пастеризация вомифала при температуре 70-80 °С в течение 30 мин, а также автоклавирование при 1.1 дополнительной атмосфере и 121 °С в течение 45 мин не снижают его противовирусную активность.

Целью работы было выявление влияния вомифала на ряд цитологических и цитоморфометрических показателей клеток в условиях *in vitro*.

**Материалы и методы исследований.** *Клетки.* ВНК-21—культура клеток эмбриональной почки хомяка. Клетки культивировались в среде Eagle MEM, с добавлением 10% бычьей сыворотки (BS). Посевная доза  $2 \times 10^5$  клеток/мл. Монослой получали через 24 ч после начала пассирования. Все исследования начинались на 24-часовом монослое клеток.

*Цитологические и цитометрические исследования.* Исследуемые клетки выращивались на стеклах, помещенных в 6-луночные планшеты в условиях 5% насыщения CO<sub>2</sub> и 100% влажности. Клетки извлекались через 24, 48 и 72 ч. Исходной точкой являлся 24-часовой монослой. Все последующие измерения проводились на парных стеклах (24+24 ч Контроль; 24 ч монослой+24 ч вомифал + 48 ч контроль; 24 ч + 48 ч вомифал).

*Цитофотометрия ДНК.* Для цитохимических и цитологических исследований весь материал фиксировали в 96<sup>0</sup> этиловом спирте в течение 30 мин, а затем одновременно окрашивали основным фуксином по Фельгену. Гидролиз ДНК проводили в 5N HCl в течение 1 ч при  $t = 22^{\circ}\text{C}$  ( в термостате) и красили реактивом Шиффа по Стоуэлу [15].

Количественное определение комплекса ДНК-фуксин производили на сканирующем микроскопе-фотометре SMP-05 (Orton), оснащенный компьютером и видеокамерой, телевизионным методом на максимуме поглощения комплекса ДНК-фуксин (длина волны 575 нм). Измерения содержания ДНК в каждом случае производили в 100 ядрах. Вычисляли среднее содержание ДНК (в условно сравнимых единицах), определяли площадь и периметр ядер и ядрышек и подсчитывали среднее число ядрышек в ядрах. Затем на основании полученного материала по содержанию в ядрах ДНК строили гистограммы их распределения по плоидности. Для построения гистограмм определяли диплоидный эталон ДНК в ядрах лимфоцитов периферической крови человека. Каждое ядрышко в ядре клетки оконтуривалось и вычислялось вне данных ядра. Ядрышковая ДНК определялась в фибриллярном центре и соединенном с ним около- и периядрышковом хроматине.

При переводе данных условных единиц в единицы плоидности нами использовались в качестве диплоидного и тетраплоидного стандарта ядра гепатоцитов мыши (рис 1).

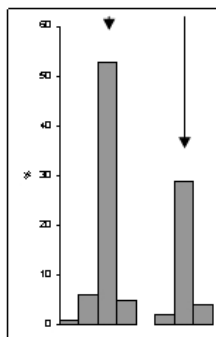


Рис 1. Распределение содержания ДНК в ядрах гепатоцитов здоровых мышей. По горизонтали – плоидность ядер; по вертикали – число ядер. Классовый промежуток равен 10% от единицы плоидности. Стрелками указаны пиковые значения, эквивалентные диплоидному и тетраплоидному стандарту

*Определение интерферогенного действия вомифала.* Для определения возможной индукции  $\beta$ -интерферона под действием препарата использовались культуры эмбриональной почки хомяка ВНК-21.

Надосадочная жидкость культивируемых клеток собиралась в 2 срока – через 24 и 48 ч после начала инкубации. В опытные лунки вносился препарат в указанной дозе, а в контрольные – чистая среда Eagle MEM. Определение в надосадочной жидкости интерферона- $\beta$  (ИФН- $\beta$ ) проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА).

**Результаты и обсуждение.** Данные цитометрического анализа клеток ВНК-21 в контроле и под воздействием вомифала приведены в табл. 1.

**Таблица 1**

**Цитометрия ядер клеток ВНК-21 в контроле и под воздействием вомифала в процессе культивирования**

	Ядро	
	площадь	периметр
Сроки	24+24 ч	
ВНК	59.2±1.7	19.1±0.4
ВНК+V	54.6±2.8	16.5±0.5
Сроки	24+48ч	
ВНК	54.1±2.4	16.7±0.4
ВНК+V	50.6±2.4	16.8±0.4
Сроки	24+72ч	
ВНК	55.2±2.8	17.2±0.5
ВНК+V	48.2±2.3*	15.9±0.4

\* $p < 0.1$

Как следует из таблицы, существенных изменений цитометрических показателей клеток под воздействием вомифала не выявлено за исключением тенденции к снижению площади ядер при 72-часовой инкубации. Надо отметить, что все изучаемые показатели как в опытных, так и контрольных группах имеют тенденцию к снижению.

В табл. 2 представлены данные цитометрии ядер клеток ВНК-21 в контроле и при воздействии вомифала. Данные цитометрии приведены в условных единицах (у.е.).

**Таблица 2**

**Содержание ДНК (у.е.) в ядрах и околядрышковом хроматине клеток перививных линий ВНК-21 в контроле и под воздействием вомифала в процессе культивирования**

	Ядро	Ядрышко
Сроки	24+24 ч	
ВНК	80.1±4.0	3.2±0.2
ВНК+V	77.5±4.5	4.6±0.6
Сроки	24+48 ч	
ВНК	73.4±3.7	5.7±1.9
ВНК+V	66.5±4.1	4.9±0.4
Сроки	24+72 ч	
ВНК	67.5±2.9	3.3±0.2
ВНК+V	67.9±2.3	3.7±0.3

Из таблицы следует, что с увеличением срока культивирования индекс содержания ДНК в ядрах клеток имеет тенденцию к снижению. При этом существенных отличий контрольных показателей от показателей опытных групп нами не выявлено.

Как видно из рис. 2, с увеличением инкубационного периода в контрольной популяции клеток происходит незначительное смещение гистограммы влево, т.е. происходит недостоверное уменьшение накопления ДНК в ядрах клеток. Данный процесс сопровождается снижением анеуплоидии с 58 до 32%. Нами зафиксировано снижение анеуплоидии под воздействием вомифала до 56% при 24-часовой инкубации и до 16% при 72-часовой инкубации. С учетом того, что анеуплоидия является одним из наиболее важных показателей злокачественного роста [16], можно сделать предварительный вывод об антинеопластической активности вомифала. Важным фактором, определяющим механизм изменений в классах плоидности ДНК под воздействием вомифала, является исчезновение гиподиплоидной и гипертетраплоидной популяций. Подобное действие характерно для некоторых индукторов биологически активных веществ, и в частности индукторов интерферона.

С целью изучения возможного интерферогенного действия препарата нами было проведено исследование интерферогенной способности вомифала в отношении β-ИФН. Выявлено, что препарат является индуктором β-ИФН и, вызывая синтез последнего в дозе 21.7±5.1 IU/мл, за 48 ч

обеспечивает достоверный рост уровня индуцированного эмбриональными клетками  $\beta$ -ИФН (контрольные показатели не отличались от фоновых значений –  $0.2 \pm 0.02$  IU/мл). В более ранние сроки в культуре клеток синтез  $\beta$ -ИФН не отмечался.

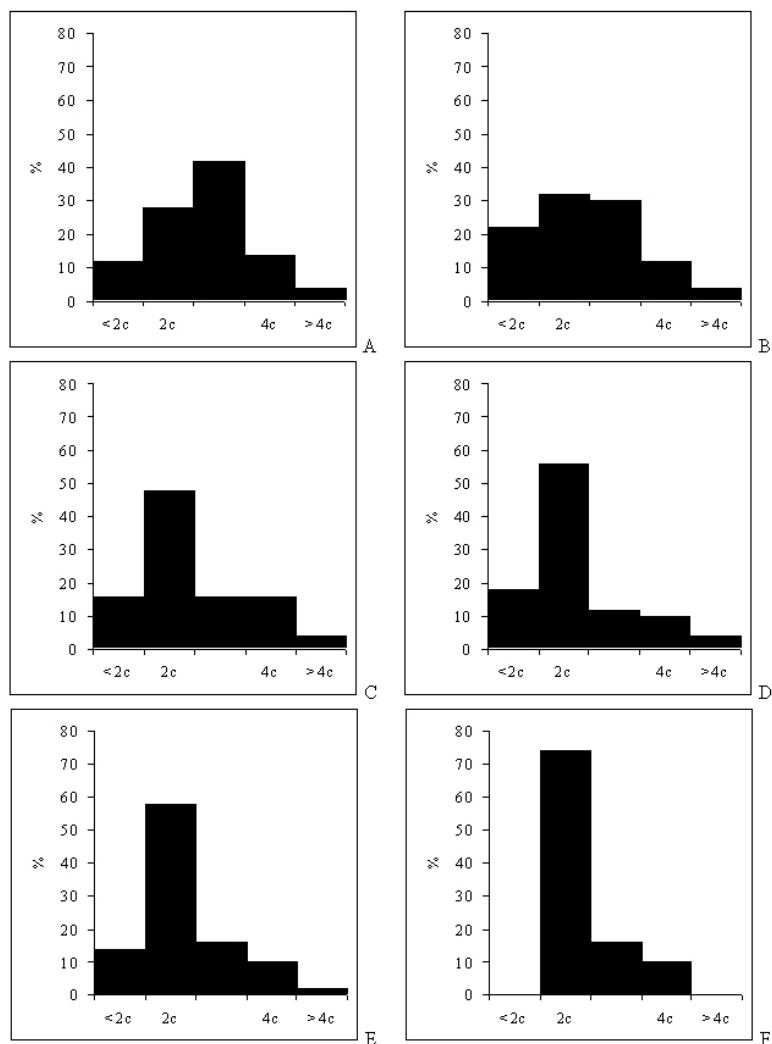


Рис 2. Распределение ядер клеток ВНК-21 по классам плоидности в норме и под воздействием вомифала: А– контроль 48 ч (24+24); В– воздействие вомифала (24 ч); С– контроль 72 ч (24+48); D– воздействие вомифала (48 ч); Е–контроль 96 ч (24+72); F– воздействие вомифала (72 ч). На оси X – классы ДНК по критерию плоидности (с), на оси Y – процент содержания клеток в популяции.

Итак, анализ воздействия вомифала на распределение ядер клеток ВНК-21 по классам плоидности ДНК показал, что препарат обладает способностью к избирательной цитотоксичности, в результате чего меняется состав клеточной популяции – из нее практически полностью исчезают гиподиплоидные и гипертетраплоидные клетки. Подобное действие связано с интерфероногенной способностью препарата

<sup>1</sup>Медицинский центр «Святой Григорий Просветитель», [aibaemer@arminco.com](mailto:aibaemer@arminco.com)

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии НАН РА

<sup>3</sup>Институт общей и неорганической химии им. М.Г. Манвеляна НАН РА, [ionx@sci.am](mailto:ionx@sci.am)

<sup>4</sup>Гематологический центр им. проф. Р.О. Еоляна МЗ РА

**А. Ф. Мирзоян, З. А. Каралян, Ф.В. Мирзоян, П. А. Казарян**

### **Механизм действия препарата из класса полиоксиметаллатов на распределение ядер клеток по классам плоидности**

Исследовано влияние препарата “вомифал” на распределение ядер клеток ВНК-21 по классам плоидности, выявлено уменьшение содержания клеток с полиплоидными ядрами и исчезновение клеток с гиподиплоидными ядрами после 72-часовой инкубации. Абсолютные показатели содержания ДНК в ядрах клеток при этом остаются без существенных изменений. Подобный эффект сходен с изменениями в клеточных культурах при воздействии интерферонов (ИФН). Выявлено достоверное возрастание количества  $\beta$ -ИФН под влиянием вомифала к 48 ч после начала инкубации. Следовательно, эффект в отношении изменения распределения ядер клеток ВНК-21 по классам плоидности непосредственно связан с интерфероногенной активностью препарата.

**Ա. Ֆ. Միրզոյան, Չ. Ա. Կարալյան, Ֆ.Վ. Միրզոյան,  
Պ.Ա. Դազարյան**

### **Պոլիօքսիմետալատների դասին պատկանող պրեպարատի ազդեցության մեխանիզմը բջիջների միջուկների ըստ պլոիդության դասերի բաշխվածության վրա**

Հետազոտվել է “Վոմիֆալ” պրեպարատի ազդեցությունը ՎՆԿ-21 բջիջների միջուկների վրա ըստ պլոիդության դասի բաշխվածության: Բացահայտվել են պոլիպլոիդային միջուկներով բջիջների պարունակության նվազում և հիպոդիպլոիդային միջուկներով բջիջների անհետացում 72-ժամյա ինկուբացիայից հետո: Բջիջների միջուկներում ԴՆԹ-ի պարունակության բացարձակ ցուցանիշներն այս դեպքում մնում են առանց էական փոփոխությունների: Այսպիսի էֆեկտը նման է բջիջային կուլտուրաներում ինտերֆերոնների (ԻՖՆ) ազդեցությամբ կատարվող փոփոխություններին: «Վոմիֆալի» ինտերֆերոգենային ակտիվության ուսումնասիրման ընթացքում բացահայտվել է պրեպարատի ազդեցության տակ  $\beta$  ԻՖՆ-ի քանակի հավաստի աճ ինկուբացման սկզբից մոտ 48 ժամ հետո: Հետևաբար ՎՆԿ-21 բջիջների մոլեկուլների՝ ըստ պլոիդության դասերի, բաշխվածության փոփոխությանը վերա-

բերող էֆեկտը ուղղակիորեն կապված է պրեպարատի ինտերֆերոգենային ակտիվության հետ:

**A. F. Mirzoyan, Z. A. Karalyan, F. V. Mirzoyan, P. A. Ghazaryan**

### **The Mechanism of Action of the Drug from the Polyoxometalate Class on the Distribution of Cell Nuclei for Ploid Classes**

Effect of the studied medication on the distribution of the nuclei of BHK-21 cells and ploid classes showed decrease in cells with polyploid nuclei and the disappearance of cells with hypodiploid nuclei after 72 hours of incubation. The absolute rates of DNA content in nuclei of cells in this case remain essentially unchanged. Such an effect is similar to the changes in cell cultures when exposed to interferon (IFN). In the study of the interferonogenic activity of "Vomifal", a significant increase in the amount of  $\beta$ -IFN under the influence of the drug for 48 hours after the start of incubation has been detected. Hence the effect of changes in the distribution of the nuclei of BHK-21 cells by ploid class is directly related to drug's interferonogenic activity.

#### **Литература**

1. *Rhule J.T. et al.* - Chem. Rev. 1998. V. 98, P. 327-357.
2. *Hasenkopf B.* - Frontiers in Biosci. 2005. V. 10. P. 275-287.
3. *Pope M. T.* - Springer-Verlag, Berlin, 1983.
4. *Mioc U. B., Todorovic M. R., Davidovic M., Cplomban Ph., Holclaitner-Antunovic J.*- Solid State Ionics. 2005. V. 176. P. 3005-3017.
5. *Roncioni L., Sadler P. J.* - Coordination Chemistry Reviews [Online]. 2007. V. 251. P. 1633-1648.
6. *Jelkic-Stankov M.* - Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2007. V. 21. P. 8-16.
7. *Միրզոյան Ա. Փ., Միրզոյան Փ. Վ., Կազարյան Ս. Ա.* – Кровь. Ереван. 2009. № 1(9). С. 78-85.
8. *Yamase T.* - J. Mater. Chem. 2005. V.15. P. 4773-4783.
9. *Hill G. L., Weeks M. S., Schinazi R. F.* - J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 2767-2772.
10. *Ikeda S.* – Antiviral Chem. Chemother. 1993. V. 4. P. 253-262.
11. *Judd D. A., Nettles J. H., Nevins N.* - J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123(5). P. 886-897.
12. *Sarafianos S.G., Korts U.*- Biochem. J. 1996. V. 319. P. 619-626.
13. *Scinazi R., Hill G.* US Patent 009764. 2000.
14. *Mirzoyan F. V.* – In: International polyoxometalate symposium, Jacobs University, Bremen, Germany, 28 July – 1 August, 2009.
15. *Lillie R. D.* Histopathologic technique and practical histochemistry. N. Y. McGraw-Hill. 1965.
16. *Aardema M. J., Albertini S., Arni P., Henderson L. M., Kirsch -Volders M, Mackay J. M, Sarrif A. M, Stringer D. A, Taalman R. D.* - Mutat Res. 1998. Feb. V. 410(1). P. 3-79.