

ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ АНИОНОВ КРЕМНИЙ-МОЛИБДЕНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. С. А. Ковалевский¹, А. А. Гулин^{1,2}, О. А. Лопатина³, А. А. Васин^{1,2}, М. В. Мезенцева³,
Е. М. Балашов^{1,2}, Д. А. Кулемин⁴, А. И. Кулак⁴, Ф. И. Далидчик^{1,**}

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

⁴Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

*E-mail: embalashov@yandex.ru

**E-mail: domfdal@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019

После доработки 07.02.2020

Принята к публикации 13.02.2020

Методом времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (ToF-SIMS) исследованы изменения состава плазматических мембран (ПМ) фибробластов эмбриона человека под воздействием наноразмерных анионов кремний-молибденовой кислоты (КМК). Измерены и интерпретированы зависимости масс-спектров основных липидов ПМ от концентрации КМК, коррелирующие с их послойными распределениями и со сродством холестерина к фосфолипидам. Обнаружен новый для биохимии клетки эффект – значительное снижение относительного содержания в ПМ холестерина и сфингомиелина под воздействием многозарядных анионов гетерополиоксикислоты (ГПК). Для водных растворов КМК при концентрации $C \sim 10$ мкМ/л и периода воздействия 48 ч обнаружено, что количество холестерина в ПМ снижается в 2–2.5 раза, при этом количество сфингомиелина уменьшается на 20–25%. Предложен новый механизм начального воздействия ГПК на плазматические мембраны, сводящийся к селективному травлению многозарядными анионами. Согласно предлагаемому механизму на первом этапе взаимодействия аниона полиоксометаллата с клеткой осуществляется экстракция из ПМ холестерина и сфингомиелина – основных регуляторов проницаемости и микровязкости ПМ. Как следствие возросшей проницаемости ПМ в клетках возможно ускорение жизненно важных трансмембранных и латеральных процессов.

ВВЕДЕНИЕ

Класс полиоксометаллатов (ПОМ), включающий в себя и гетерополиоксикислоты (ГПК), к которым относится кремний-молибденовая кислота (КМК) ($H_4SiMo_{12}O_{40}$), – неисчерпаемое множество строго организованных неорганических (металлооксидных) наноразмерных молекул, с обширной областью возможных практических применений, от нанoeлектроники [1] и нанокатализа [2] до нанобиологии и наномедицины [3]. Бактерицидные, противораковые и противовирусные свойства ПОМ, которые активно изучаются более полувека (обзоры [4–6]), в последнее десятилетие были

дополнены примерами эффективности ПОМ-препаратов при лечении СПИДа [7], болезни Альцгеймера [8] и гепатита [9].

Точные механизмы терапевтического воздействия ПОМ-препаратов, которое всегда сопровождается побочными цитотоксическими эффектами, остаются в настоящее время предметом дискуссий. Во многих случаях предполагается, что наблюдаемый терапевтический эффект обусловлен проникновением анионов ПОМ внутрь клетки с последующим образованием связанных комплексов с различными биологическими мишенями (БМ), например с молекулами ДНК (в случае

онкологии [10]) или с молекулами бета-амилоидных пептидов (в случае болезни Альцгеймера [11]). В комплексах, содержащих ПОМ, биохимические и биофизические свойства БМ претерпевают качественные изменения, достаточные для предотвращения патологических процессов в клетках.

Решению задач, связанных с синтезом новых соединений ПОМ и апробацией этих соединений в качестве новых лечебных препаратов, воздействующих на внутриклеточные БМ, посвящено значительное количество работ [4–11]. Однако общий для всех случаев этап начального взаимодействия ПОМ с клеточными мембранами остается мало изученным. В частности, не решен вопрос о механизмах проникновения наночастиц размером 1–2 нм (к которым относятся гетерополианионы большинства ПОМ, применяемых в медицине) сквозь клеточную мембрану, хотя сам факт проникновения ПОМ-препаратов в клетку и образования внутриклеточных комплексов ПОМ с биологическими мишенями надежно установлен прямыми спектроскопическими измерениями [12–14]. Нередко допускается [15], что на начальных этапах взаимодействия анионов ПОМ с клеткой включаются не установленные до сих пор варианты эндоцитоза. Можно предположить, что эти механизмы как-то связаны с общей особенностью электронного строения ПОМ, например с большим зарядом их анионов. Известно, что заряды анионов ПОМ коррелируют с их биологической активностью [16, 17], однако микроскопические механизмы, ответственные за эту корреляцию, до сих пор не установлены.

Особенности взаимодействий многозарядных анионов ПОМ с липидными бипленками (ЛБП) теоретически и экспериментально исследовались в [18–22]. Было показано, что вопреки расхожим представлениям на поверхности ЛБП из-за биполярности липидных головок возможна хемосорбция анионов ПОМ с энергиями связи, достаточными для образования различных дефектов, в частности наноразмерных пор. Возможны (при определенных условиях) в ЛБП и фазовые переходы типа “гель–жидкий кристалл”, при которых, как и в случае достаточно большого числа поверхностных дефектов, меняются параметры текучести и микровязкости плазматических мембран (ПМ). Последнее принципиально важно.

Текучести ЛБП и микровязкости ПМ – основные биофизические характеристики клеток, от которых зависят скорости всех жизненно важных трансмембранных и межклеточных процессов. Состав искусственных ЛБП, которые могут иметь различные технические примене-

ния, отличен от состава биологических ПМ. Последние помимо совокупности фосфолипидов, число известных форм которых превышает 10^2 , содержат холестерин, который в живых клетках играет роль основного регулятора текучести [23]. В ЛБП, которые исследовались в [18–22], этого регулятора не было.

Для выяснения характера взаимодействий анионов ПОМ с реальными ПМ необходима дополнительная информация, учитывающая сложный биохимический состав клеточных мембран. Такая информация доступна современным вариантам метода времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (ToF-SIMS). В последнее десятилетие этот аналитический метод стал часто применяться для химического картирования биологических структур [24–32]. Однако для решения задач, связанных с изучением природы элементарных актов начального воздействия анионов ПОМ на плазматические мембраны, метод ToF-SIMS до настоящей работы не применялся.

Цель настоящей работы – определить, используя метод ToF-SIMS, характер изменений липидного состава ПМ под воздействием многозарядных анионов ГПК и выяснить концентрационные зависимости этих изменений для концентраций C в диапазоне от 10 до 100 мкМ/л, которые сегодня представляют наибольший интерес [4–11].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. В работе использованы водные растворы кремний-молибденовой кислоты $H_4SiMo_{12}O_{40}$ (гетерополикислота (ГПК) типа Кеггина) производства фирмы “Biochem” (Франция).

Воздействие КМК на плазматические мембраны исследовали на перевиваемых клетках фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ), предоставленных Всероссийской коллекцией клеточных культур при ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России. Для культивирования клеток использовали стандартную питательную среду (ПС) “Игла МЭМ” (ООО “Биолот”, Санкт-Петербург) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Life Technologies, USA).

Пробоподготовка препаратов клеток для ToF-SIMS-анализа. Клетки ФЭЧ вносили в шестилуночную панель фирмы “Costar”. На дно каждой лунки помещали простерилизованные кремниевые пластины (J&J Co., Южная Корея). В начале эксперимента в каждую лунку вносили по 2 мл ПС, содержащей клетки ФЭЧ в концентрации 40000 клеток/мл. Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 24 ч при температуре

+37°C в атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂ и 100%-ной влажностью. Через 24 ч в лунки добавляли по 200 мкл ПС, содержащей КМК в количестве, необходимом для получения общей концентрации КМК в лунках в 100, 12.5 и 10 мкМ/л. В контрольные лунки добавляли питательную среду без КМК. Продолжали инкубировать в течение 48 ч в тех же условиях. Затем ПС удаляли, адсорбированные на поверхности пластин клетки фиксировали в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида в течение 30 мин и 3 раза промывали фосфатным буфером для удаления КМК. После промывки фосфатным буфером клетки промывали дистиллированной водой (*mQ*) для удаления неорганических соединений с поверхности клеток. После чего препарат высушивали под потоком аргона в течение 4 ч и помещали в камеру масс-спектрометра. Такой метод подготовки образцов приводит к тому, что анализируются только клетки, не потерявшие связь с поверхностью (или с соседними клетками).

ToF-SIMS-анализ. В основе метода ToF-SIMS лежат процессы распыления исследуемых образцов (препаратов) пучками положительных ускоренных ионов (1–40 кэВ), вызывающих эмиссию медленных (~1 эВ) вторичных ионов (ВИ), масс-спектры которых содержат информацию о химическом составе и строении поверхности изучаемых (облучаемых) объектов.

Все измерения были проведены на времяпротлетном масс-спектрометре вторичных ионов ToF-SIMS 5 (ION-ToF GmbH, Германия) в условиях высокого вакуума, исключающих возможность столкновения ВИ с молекулами остаточных газов.

Препараты – кремниевые пластины с адсорбированными клетками ФЭЧ – облучали сфокусированным пучком первичных ионов Bi₃⁺ с энергиями 30 кэВ. Для компенсации статических зарядов применялась электронная пушка. Диаметр пучка первичных ионов составлял 5 мкм, что сопоставимо с размерами клеток ФЭЧ. Длительности импульсов первичных ионов не превышали 20 нс. Плотность дозы облучения первичными ионами составляла ~2.5 × 10¹¹ ионов/см², что исключало возможность изменения липидного состава ПМ клеток под воздействием первичных ионов Bi₃⁺. Позиционирование первичного пучка на исследуемую область образца осуществлялось с помощью микровидеокамеры, встроенной в масс-спектрометр. Измерения *m/z*-спектров ВИ проводили на участках поверхности размером ~300 × 300 нм, заполненных адсорбированными клетками. Для каждого участка результаты спектроскопических измерений усреднялись по 15 случайным выбранным точкам.

Анализ спектров методом главных компонент. Масс-спектры клеток разделяли на несколько спектральных диапазонов *m/z*. В программе SurfaceLab (ION-ToF, Германия) для каждого образца в каждом спектральном диапазоне выбирали набор наиболее интенсивных пиков. Полученный список пиков объединяли в один общий, который анализировали с применением программы NVTtoolbox (NESAC/BIO, США). Способом, описанным в [33], для полученных данных был установлен 95%-ный доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность фрагментации ВИ и присоединения к ним различных атомов, молекул или радикалов проявляется в масс-спектрах биоматериалов формированием большого числа пиков, из которых только небольшая часть относится к молекулам образца какого-либо одного, строго определенного типа. Важным примером таких характерных пиков являются сигналы ионов со значениями *m/z*, равными 369.35 и 385.33, которые соответствуют ионам [C₂₇H₄₅]⁺ и [C₂₇H₄₅O]⁺. Известно, что эти ВИ образуются преимущественно из холестерина (C₂₇H₄₆O) [34], в то время как другие ВИ не могут быть однозначно идентифицированы, так как могут быть фрагментами разных фосфолипидов. По этой причине анализ масс-спектров биологических материалов оказывается в общем случае сложной задачей, для решения которой часто применяются методы классификации, основанные на уменьшении размерности данных. Один из наиболее простых и хорошо известных методов – метод главных компонент (англ. *principal component analysis*) [35, 36], позволяющий уменьшить число переменных, оставив для анализа лишь те, которые меняются наиболее существенно относительно среднего значения. Применительно к масс-спектрометрии метод заключается в выборке наиболее интенсивных пиков в масс-спектрах. Среди данных пиков отбираются ионы с наибольшей вариацией относительно средней интенсивности. Совокупность данных ионов с различными статистическими весами определяет первую главную компоненту. Таким образом, первая главная компонента имеет наибольшую выборочную дисперсию. Вторая и последующие главные компоненты определяются аналогичным образом с тем условием, что они должны быть некоррелированы с первой главной компонентой. Результаты в методе главных координат обычно представляют в виде графика в координатах первых двух главных компонент, что позволяет оценить как вариацию данных в пределах одного образца

(степень воспроизводимости масс-спектров), так и различие данных, относящихся к разным образцам. Для каждого образца на основе вариации его масс-спектров строится 95%-ный доверительный интервал, имеющий обычно форму эллипса. Отсутствие пересечений эллипсов, построенных для двух каких-то образцов, свидетельствует о статистически значимых различиях их составов.

Результаты проведенных экспериментов, позволяющие сделать вывод об изменениях состава липидов мембраны под воздействием растворов КМК варьируемых концентраций, приведены на рис. 1а. На рис. 1б и 1в приведены данные о том, какие пики масс-спектров менялись при вариациях концентраций КМК в наибольшей степени.

Приведенные на рис. 1а результаты показывают, что при выбранной длительности воздействий КПК на клетки ФЭЧ (48 ч) первые слабо выраженные изменения в липидном составе ПМ фиксируются только при концентрациях $C \sim 10$ мкМ/л. Эллипсы, относящиеся к контрольным измерениям ($C = 0$) и измерениям при $C \sim 10$ мкМ/л уже частично пересекаются. При несколько больших концентрациях ($C = 12.5$ мкМ/л) соответствующие эллипсы оказываются полностью разделенными. Это указывает на достаточно большие изменения в составе и строении ПМ при таких концентрациях. Данные, соответствующие масс-спектрам, измеренным для клеток, на которые в течение 48 ч воздействовали растворы КМК с концентрацией $C = 100$ мкМ/л, имеют достаточно большой разброс по первой главной компоненте (ось абсцисс) (рис. 1а). Столь сильное изменение указывает на значительные изменения состава и строения ПМ в рассматриваемом случае. Характер этих изменений можно оценить, анализируя электронно-микроскопические изображения ультратонких срезов цитоплазмы клеток ФЭЧ после воздействия на них растворов ГПК различных концентраций [37, 38]. Результаты этих работ показывают, что при высоких концентрациях (100–300 мкМ/л и выше) действие ГПК Кеггина на клетки ФЭЧ приводит к образованию аутофагосом и деструкции мембраны клеток. Учитывая протокол пробоподготовки препаратов для ToF-SIMS-анализа, принятый в настоящей работе, следует ожидать, что результаты, приведенные на рис. 1а для наибольших концентраций, могут относиться к частично поврежденным ПМ.

Графики нагрузок, приведенные рис. 1б и 1в, позволяют определить, какие ионы в наибольшей степени характеризуют различия в масс-спектрах, измеренных для образцов с различными значениями концентраций. Нетрудно видеть, что это ионы с $m/z = 58, 88, 124, 125, 184, 185,$

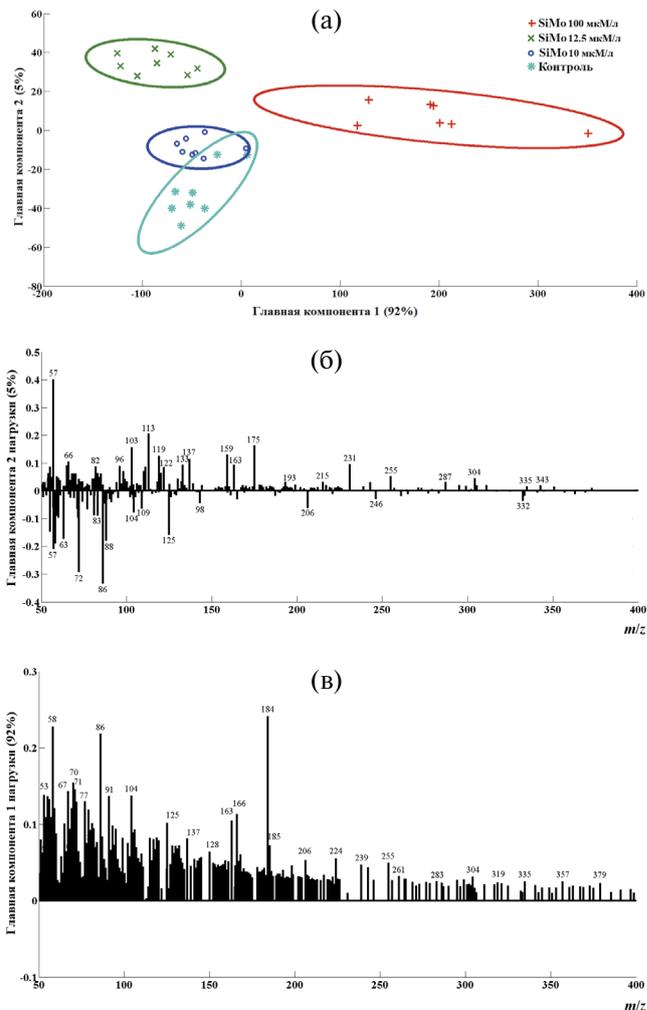


Рис. 1. Рентгеноструктурный анализ состава плазматической мембраны клеток ФЭЧ, обработанной гетерополиокислотой различной концентрации (100, 12.5 и 10 мкМ/л). Эллипсы показывают границы 95%-ного доверительного интервала (а). Нагрузка на главную координату PC2, показывающая m/z ионов, в наибольшей степени ответственных за разделение данных по оси ординат (б). Нагрузка на главную координату PC1, показывающая m/z ионов, в наибольшей степени ответственных за разделение данных по оси абсцисс (в).

224, 369 и 385. Эти ВИ являются фрагментами головных частей четырех основных типов липидов ПМ – сфингомиелина (SM), фосфатидилхолина (PC), фосфатидилсерина (PS) и фосфатидилэтаноламина (PE), а также фрагментами холестерина. Точные значения параметра m/z для этих ионов, а также информация о преимущественном послыном расположении соответствующих липидов в ПМ приведены в табл. 1, составленной по результатам масс-спектрометрических измерений.

Рассмотрим некоторые особенности концентрационных зависимостей масс-спектров ВИ,

Таблица 1. Основные липиды ПМ

Липид	Общие m/z	Характерные m/z	Области преимущественной локализации [39–41]
Сфингомиелин [39]	58.07, 86.10, 166.07, 184.08	264.28, 265.26,	Внешняя (основная) и внутренняя (менее выраженная)
Фосфатидилхолин [44, 45]	58.07, 86.10, 166.07, 184.08	224.11	Внешняя (основная) и внутренняя (менее выраженная)
Фосфатидилсерин [39]		88.04,	Внутренняя (плазменная)
Фосфатидилэтаноламин [34, 44]		124.01, 142.03	Внутренняя (плазменная)
Холестерин [34, 44]		369.35, 385.4	Внешняя и внутренняя

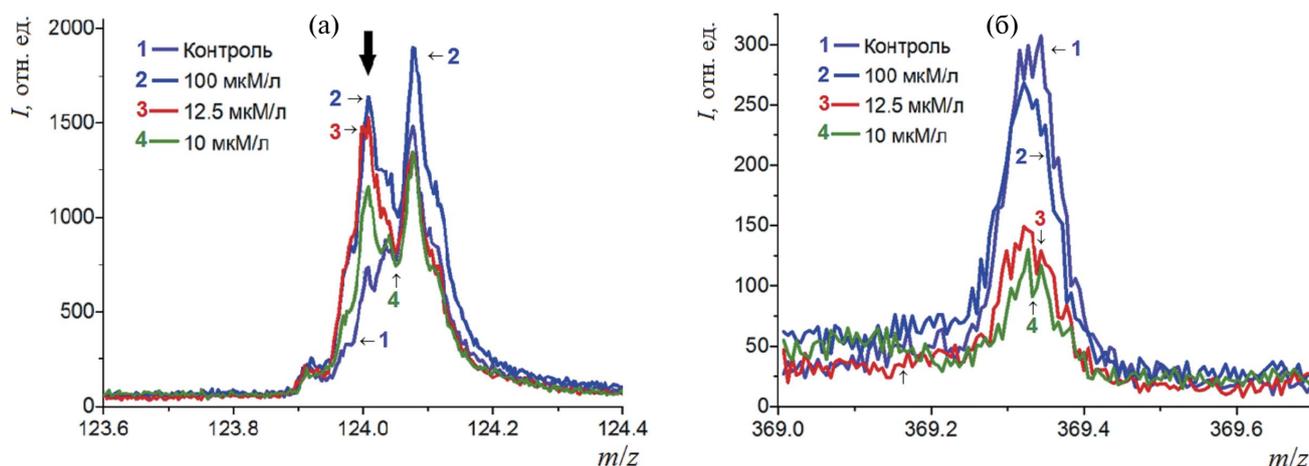


Рис. 2. Примеры масс-спектров, демонстрирующие монотонные и немонотонные зависимости от концентрации КМК: а – пик с $m/z = 124.01$ соответствует фосфатидэтаноламину, б – пик холестерина $m/z = 369.35$. Концентрации КМК указаны во вставке. Результаты разовых измерений.

приведенных на рис. 2 и 3. Отдельные примеры усредненных масс-спектров представлены на рис. 2. Примеры выбраны для демонстрации существования двух основных типов концентрационных зависимостей масс-спектров липидов, входящих в состав плазматических мембран ФЭЧ. Как можно видеть, на интервале изменений концентраций $C = 0–100$ мкМ/л эти зависимости могут быть монотонными и немонотонными. Пример монотонных

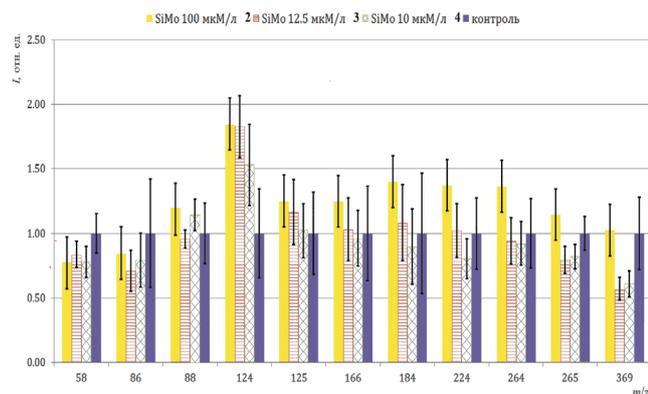


Рис. 3. Усредненные нормированные зависимости сигналов вторичных ионов основных липидов от концентрации КМК.

зависимостей, которым соответствует неравенство $\delta J_0 / \delta C > 0$ ($J_0(C)$ – максимальная интенсивность сигнала), представлен спектром, показанным на рис. 2а ($m/z = 124.01$). Согласно идентификации, приведенной в [34, 39], эта масса соответствует иону $C_2H_7NO_3P^+$, являющемуся фрагментом головной части PE. Второй пик на рисунке с массой $m/z = 124.09$, скорее всего, можно отнести к иону $C_8H_{12}O^+$, являющемуся фрагментом хвоста ненасыщенной жирной кислоты глицерофосфоэтаноламина. Он демонстрирует пример иной, немонотонной зависимости, для которой $\delta J_0 / \delta C$ меняет знак в рассматриваемом интервале изменений C . Еще более ярким примером немонотонной зависимости являются результаты, полученные для холестерина $m/z = 369.35$ (рис. 2б). Отметим, что в первом случае (для $m/z = 124.01$) на C -зависимости можно обнаружить только слабовыраженный минимум (при $C \sim 10–12.5$ мкМ/л), в то время как для холестерина аналогичный минимум ярко выражен (сигнал снижается в 2–2.5 раза) и наблюдается при концентрациях, которым соответствуют лишь незначительные изменения сигналов всех других липидов.

Подобные концентрационные зависимости, монотонные и немонотонные, можно заметить

на усредненных спектрах (рис. 3). Следовательно, эти характерные зависимости не могут быть отнесены к отдельным точкам на поверхности ПМ, но отражают общие, характерные изменения состава и строения изучаемых мембран под воздействием многозарядных анионов КМК. Чтобы понять природу изменений, достаточно заметить корреляции C -зависимостей пиков различных ВИ с послойными распределениями липидов, к которым эти ионы могут относиться. Нетрудно убедиться в том, что в случаях, когда соответствующий липид может находиться преимущественно на одной стороне ПМ (внешней или внутренней), для C -зависимости масс-спектра наблюдается монотонная зависимость, спадающая ($\delta J_0/\delta C < 0$) или растущая ($\delta J_0/\delta C > 0$) соответственно. Согласно информации, приведенной в табл. 1 и на рис. 3, это имеет место для PC + SM ($m/z = 58.07$) и PE (124.01) соответственно. В тех случаях, когда липид может быть найден в сопоставимых количествах в обоих слоях, наблюдаемые C -зависимости оказываются немонотонными. Это относится прежде всего к холестерину ($m/z = 369.35$). Промежуточной ситуации соответствуют все остальные (асимметричные) C -зависимости со слабовыраженными, в отдельных случаях достоверными (сигналы 184, 224, 264 и 265) минимумами. Отметим, что в пределах точности всем этим случаям так же, как в случае холестерина, соответствует примерное равенство пиков при нулевой и максимальной концентрациях КМК.

Простейший механизм, которым можно объяснить формирование масс-спектров, коррелирующих с расположением соответствующих липидов ЛБП, предполагает селективное травление ПМ многозарядными анионами ПОМ. В рамках этой простой модели, которая использует и расширяет представления работ [18–22], активизация травления при повышении концентрации КМК приводит к росту числа поверхностных дефектов во внешнем слое и, соответственно, к нарастающему разрушению ПМ. Малые концентрации, которым можно сопоставить стадии начального разрушения, снижение сигналов от головок SM и PC и холестерина, естественно связать с их убылью во внешнем слое. Это снижение, естественно, должно сменяться ростом, когда по мере разрушения внешнего слоя становятся доступными липиды внутреннего (плазменного) слоя. В случаях, когда какой-либо фосфолипид находится преимущественно только на плазменной стороне, снижения его сигнала с ростом C наблюдаться не может. В этих условиях для C -зависимостей возможен только монотонный рост. Согласно результатам измерений, приведенным на рис. 3, это имеет место для пика 124.01 (PE).

Обсудим примеры немонотонных C -зависимостей масс-спектров. На рис. 3 этим примерам соответствуют усредненные результаты, полученные для холестерина (369.35), SM (265.26), PC (224.11) и ионов 166.07 и 184.08. Последние, согласно табл. 1, могут относиться и к SM, и к PC. Как можно видеть, при малых значениях $C \neq 0$ все эти пики имеют меньшие (по отношению к контрольным) значения. Отсюда следует, что на начальных этапах воздействия ПОМ на плазматические мембраны содержание каждого из этих липидов во внешнем слое уменьшается, однако снижение существенно зависит от типа липида. Снижение максимально (~ 40 – 50%) для холестерина, молекулы которого нейтральны. Для всех других липидов начальное снижение пиков заметно меньше (~ 10 – 20% для SM) или много меньше (в пределах точности эксперимента изменения отсутствуют), чем в случае холестерина. Отсюда следует принципиально важный вывод о селективности актов воздействия многозарядных анионов ПОМ на липиды ПМ, среди которых на первых этапах преобладают акты экстракции неполярных молекул холестерина. Экстракция других липидов, как это следует из результатов проведенных измерений, приведенных на рис. 3, менее вероятна¹.

Приведем выводы, сделанные на основании полученных результатов. Как основной, отметим факт селективного воздействия многозарядных анионов ГПК на плазматическую мембрану. Эффект начального истощения холестерина клеточной мембраны под воздействием КМК, впервые обнаруженный в настоящей работе, расширяет существующие представления о механизмах проникновения многозарядных анионов ПОМ сквозь клеточные мембраны и позволяет объяснить природу общей высокой биологической активности этих соединений. В обоих случаях причина наблюдаемых эффектов может быть связана с частичной экстракцией холестерина из ПМ и, соответственно, с достаточно существенными изменениями биофизических свойств клетки. Например, известно, что экстракция холестерина может сопровождаться потерей прочности ПМ и ускорением жизненно важных трансмембранных и латеральных диффузионных процессов [43]. В частности, переноса сквозь мембрану тех же анионов ПОМ, которые, попав внутрь клетки, приобретают способность поражать

¹ Хорошо известные значения сродства SM и PC к холестерину, δ , находятся по величине в той же последовательности, что и масштабы начального снижения соответствующих пиков масс-спектров: δ (SM) $>$ δ (PC) [42]. Естественно предположить, что в некоторых случаях молекулы холестерина покидают ПМ одновременно с биполярными головками фосфолипидов (SM, PC, PS и PE). Сходство зависимостей пиков холестерина (369) и SM (265) от C (рис. 3) подтверждают это предположение.

различные БМ, запуская цепочки биохимических процессов, ведущих к апоптозу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отметим возможность некоторых практических применений результатов настоящей работы.

Перспектива управления проницаемостью клеточных мембран посредством дозированного воздействия полиоксометаллатов представляет интерес для решения задач, связанных с ускорением процессов доставки лекарственных препаратов к внутриклеточным мишеням. Например, доставки к молекулам ДНК противораковых препаратов. Это один из возможных синергетических эффектов, который естественно ожидать при совместном тестировании каких-либо уже известных лечебных препаратов и новых, содержащих полиоксометаллаты.

Другое интересное использование эффекта экстракции холестерина из плазматических мембран может быть связано с регулируемым разрушением анионами полиоксометаллатов холестерин-сфингомиелиновых рафтов. Последние, как хорошо известно, играют роль преимущественных мест адсорбции и сборки вирионов [44] на поверхности клеток, в частности вирусов гриппа. Это один из множества общих, возможных, механизмов формирования противовирусной активности полиоксометаллатов.

Благодарности. 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 (регистрационный номер АААА-А18-118012390045-2) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-54-00004 Бел_а) и Белорусского фонда фундаментальных исследований (договор № X18P-110).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cooper G.I.T., Kitson P.I., Winter R. et al. Modular redox-active inorganic chemical cells: iCHELLs // *Angew. Chem., Int. Ed.* 2011. V. 50. P. 10373. <https://doi.org/10.1002/anie.201105068>.
2. Song I.K., Lyons I.E., Bartheau M.A. Correlation of alkane oxidation performance with STM and tunneling spectroscopy measurements of heteropolyacid catalysts // *Catal. Today*. 2003. V. 81. P. 137. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(03\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(03)00107-X).
3. Pope M.T. Polyoxometalates. In *Encyclopedia of Inorganic & Bioinorganic Chemistry*, 1st ed. / Ed. Scott R.A. Somerset; NJ; USA: John Wiley and Sons, Inc., 2011. 208 p.
4. Rhule J.T., Hill C.L., Judd D.A. et al. Polyoxometalates in medicine // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 327. <https://doi.org/10.1021/cr960396q>.
5. Hasenknopf B. Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications // *Frontiers in Bioscience*. 2005. V. 10. № 1. P. 275. DOI: 10.2741/1527.
6. Bijelic A., Aureliano M., Rompel A. The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. P. 1143. Article in *Angewandte Chemie* · June 2018. DOI: 10.1039/C7CC07549A.
7. Wang X., Wang J., Zhang W. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry by a Keggin polyoxometalate // *Viruses* 2018. V. 10. № 5. P. 265. <https://doi.org/10.3390/v10050265>.
8. Gao N., Sun H., Dong K. et al. Transition-metal-substituted polyoxometalate derivatives as functional antiamyloid agents for Alzheimer's disease // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3422. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/753751>.
9. Qi Y., Xiang Y., Wang J. et al. Inhibition of hepatitis C virus infection by polyoxometalates // *Antiviral Res.* 2013. V. 100. № 2. P. 392. <https://doi.org/10.2217/fvl.14.89>.
10. Qi W., Qin Y., Qi Y. et al. *In vitro* antitumor activity of a Keggin vanadium-substituted polyoxomolybdate and its ctDNA binding properties // *Journal of Chemistry* 2014. V. 2015. Article ID 753751. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/753751>.
11. Wang L., Yu K., Zhu J. et al. Inhibitory effects of different substituted transition metal-based krebbs-type sandwich structures on human hepatocellular carcinoma cells // *Dalton Trans.* 2017. V. 46. P. 2874. DOI: 10.1039/C6DT02420C.
12. Geisberger G., Gyenge E.B., Maake C. et al. Trimethyl and carboxymethyl chitosan carriers for bio-active polymer-inorganic nanocomposites // *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 91. P. 58. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.08.009.
13. Dianat S., Bordbar A.K., Tangestaninejad S. et al. *In vitro* antitumor activity of parent and nano-encapsulated mono cobalt-substituted Keggin polyoxotungstate and its ctDNA binding properties // *Chem.-Biol. Interact.* 2014. V. 215. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.02.011>.
14. Dianat S., Bordbar A.K., Tangestaninejad S. et al. ctDNA interaction of Co-containing Keggin polyoxomolybdate and *in vitro* antitumor activity of free and its nano-encapsulated derivatives // *J. Iran. Chem. Soc.* 2016. V. 13. P. 1895. DOI: 10.1007/s13738-016-0906-y.
15. Bijelic A., Aureliano M., Rompel A. Polyoxometalates as potential next-generation metallodrugs in the combat against cancer // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019. V. 58. № 10. P. 2980. DOI: 10.1002/anie.201803868.
16. Gumerova N.I., Al-Sayed E., Krivosudský L. et al. Antibacterial activity of polyoxometalates against *Moraxella catarrhalis* // *Frontiers in Chemistry* 2018. V. 6. P. 336. DOI: 10.3389/fchem.2018.00336.
17. Лопатина О.А., Суетина И.А., Мезенцева М.В. и др. Влияние заряда аниона на биологическую активность гетерополиоксидов Кеггина // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 1. С. 52.
18. Nabika H., Inomata Y., Itoh E., Unoura K. Activity of Keggin and Dawson polyoxometalates toward model cell membrane // *RSC Adv.* 2013. V. 3. P. 21271. DOI: 10.1039/C3RA41522H.

19. Nabika H., Sakamoto A., Tero R. et al. Imaging characterization of cluster-induced morphological changes of a model cell membrane // *J. Phys. Chem. C* 2016. V. 120. P. 15640. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08014>.
20. Jing B., Hutin M., Connor E. et al. Polyoxometalate macroion induced phase and morphology instability of lipid membrane // *Chem. Sci.* 2013. V. 4. P. 3818. DOI: 10.1039/C3SC51404H.
21. Kobayashi D., Ouchi Y., Sadakane M. et al. Structural dependence of the effects of polyoxometalates on liposome collapse activity // *Chem. Lett.* 2017. V. 46. P. 533. <https://doi.org/10.1246/cl.161172>.
22. Kobayashi D., Nakahara H., Shibata O. et al. Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions between polyoxometalates and lipid molecules // *J. Phys. Chem. C* 2017. V. 121. P. 12895. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b01774>.
23. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. М.: Наука, 1982. 224 с.
24. Chughtai K., Heeren R.M. Mass spectrometry imaging for biomedical tissue analysis // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 3237. <https://doi.org/10.1021/cr100012c>.
25. Hua X., Marshall M.J., Xiong Y. et al. Two-dimensional and three-dimensional dynamic imaging of live biofilms in a microchannel by time-of-flight secondary ion mass spectrometry // *Biomicrofluidics* 2015. V. 9. P. 031101. <https://doi.org/10.1039/c3ay26513g>.
26. Bich C., Touboul D., Brunelle A. Cluster TOF-SIMS imaging as a tool for micrometric histology of lipids in tissue // *Mass Spec. Rev.* 2014. V. 33. P. 442. <https://doi.org/10.1002/mas.21399>.
27. Winograd N. Gas cluster ion beams for secondary ion mass spectrometry // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2018. V. 11. P. 29. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045249>.
28. Passarelli M.K., Winograd N. Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1811. P. 976. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2011.05.007>.
29. Vanbellingen Q.P., Castellanos A., Rodriguez-Silva M. et al. Analysis of chemotherapeutic drug delivery at the single cell level using 3D-MSI-ToF-SIMS // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2016. V. 27. № 12. P. 2033. DOI: 10.1007/s13361-016-1485-y.
30. Jungnickel H., Laux P., Luch A. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS): A new tool for the analysis of toxicological effects on single cell level // *Toxics* 2016. V. 4. № 1. P. 5. DOI: 10.3390/toxics4010005.
31. Winograd N. Imaging mass spectrometry on the nanoscale with cluster ion beams // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 328. DOI: 10.1021/ac503650p.
32. Погорелов А.Г., Гулин А.А., Погорелова В.Н. и др. Особенности применения метода ToF-SIMS для анализа биоорганических образцов // *Биофизика* 2018. Т. 63. № 2. С. 303.
33. Wagner M.S., Castner D.G. Characterization of Adsorbed Protein Films by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry with Principal Component Analysis // *Langmuir.* 2001. V. 17. № 15. P. 4649. <https://doi.org/10.1021/la001209t>.
34. Sostarecz A.G., McQuaw C.M., Ewing A.G., Winograd N. Phosphatidylethanolamine-induced cholesterol domains chemically identified with mass spectrometric imaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126 (43). P. 13882. DOI: 10.1021/ja0472127.
35. Urbini M., Petito V., de Notaristefani F. et al. ToF-SIMS and principal component analysis of lipids and amino acids from inflamed and dysplastic human colonic mucosa // *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2017. V. 409. № 26. P. 6097. DOI: 10.1007/s00216-017-0546-9.
36. Bro R., Smilde A.K. Principal component analysis // *Anal. Methods* 2014. V. 6. P. 2812. DOI: 10.1039/C3AY41907J.
37. Ковалевский С.А., Лопатина О.А., Далидчик Ф.И. и др. Воздействие гетерополикислот Кеггина на клетки фибробластов эмбриона человека. Российские нанотехнологии. 2018. Т. 13. № 7–8. С. 51.
38. Сутина И.А., Мезенцева М.В., Гущина Е.А. и др. Изучение ростовой активности и жизнеспособности культивируемых фибробластов эмбриона человека под воздействием полиоксаметаллатов // Информационный бюллетень “Клеточные культуры” 2015. Т. 31. С. 67.
39. Draude F., Körsgen M., Pelster A. et al. Characterization of freeze-fractured epithelial plasma membranes on nanometer scale with ToF-SIMS // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2014. V. 407(8). P. 2203. DOI: 10.1007/s00216-014-8334-2.
40. Бергельсон Л.Д. Мембраны, молекулы, клетки. М.: Наука, 1982. 183 с.
41. Bittman R., Rottem S. Distribution of cholesterol between the outer and inner halves of the lipid bilayer of Mycoplasma cell membranes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976. V. 71. P. 318. DOI: 10.1016/0006-291x(76)90285-0.
42. Иванова Л.И. Влияние холестерина на плазматические мембраны опухолевых и нормальных клеток. Дис. ... канд. биол. наук. 1984, Москва. Специальность ВАК РФ 03.00.04, с. 114.
43. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. М.: Наука, 1982. 224 с.
44. Cui J, Fu X., Xie J. et al. Critical role of cellular cholesterol in bovine rotavirus infection // *Virology Journal.* 2014. V. 11. Article number 98. DOI: 10.1186/1743-422X-11-98.