9. Галегов Г.А., Львов Н.Д., Петрова И.Р., Флорентьев В.Л. Рибавирин как антивирусный химиопрепарат: химия, молекулярный механизм действия, возможности клинического применения. Вопр. Мед. Хим. 1986, 32 (1): 10–19.

ИЗМЕНЕНИЕ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТОВ

И.А. Суетина¹, М.В. Мезенцева¹, Е.А. Гущина¹, Ф.А. Лисицин¹, Л.И. Руссу¹, О.А. Лопатина¹, Е.Л. Фирсова¹, С.А.Ковалевский², Б.А.Буданов², Ф.И. Далидчик², А.С. Селезнев³, Р.А. Морозов³

¹ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва <u>cells@rambler.ru</u>; ² ФГБУ Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва; ³ Зеленоградский нанотехнологический центр, Москва.

С целью изучения влияния наноматериалов на морфофункциональные характеристики клеток проведено сравнительное тестирование препаратов наночастиц – полиоксометаллатов (ПОМ) в культуре фибробластов эмбриона человека линии ФЭЧ-Т. Эксперименты выполнены с полиоксиметаллатами H₃PW₁₂O₄₀, H₄SiW₁₂O₄₀, H₄SiMo₁₂O₄₀ и H₃PMo₁₂O₄₀, которые в разных концентрациях добавляли в среду культивирования клеток. Показано различное токсическое воздействие исследуемых препаратов на клетки. С помощью MTT-теста выявлено снижение пролиферации клеток в процессе их инкубации с изучаемыми препаратами в концентрации 625–5000 мкМ/мл. Наибольшая цитотоксичность через 24 часа инкубации выявлена у препарата H₃PW₁₂O₄₀, содержащего атомы вольфрама, наименьшая – у препарата H₄SiMo₁₂O₄₀, содержащего атомы молибдена, что может свидетельствовать о зависимости степени воздействия тестируемых ПОМ на клетки от физико-химических свойств препаратов.

На электронных микрофотографиях, полученных с помощью трансмиссионной и растровой электронной микроскопии, обнаружены патологическое изменения морфологии клеток при их инкубации в течение 48 часов с исследуемыми ПОМ – разрушение мембранных структур цитоплазмы клеток, деструкция ядер, увеличение количества и размеров вакуолей в цитоплазме, появление множества аутофагосом и др.

Изучено потенциальное влияние тестируемых препаратов наночастиц на параметры иммунитета. Все препараты в разведениях 1\100–1\500 способствовали активации в

культивируемых фибробластах транскрипции цитокинов ИЛ-18, ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНО-α, а также активации экспрессии генов интерферонов I, II, III типов (ИФН-α/β, ИФН-γ, ИФН-λ).

Ключевые слова: наночастицы, полиоксометаллаты, пролиферация клеток, электронная микроскопия, цитокины.

В результате быстрого развития нанотехнологии, а также применения её разработок в разных областях науки и в медицине, исследования биологических эффектов наноматериалов становятся все более актуальными и тесно связаны с изучением их цитотоксичности, генотоксичности и экотоксичности. Частицы наноматериалов радикальным образом отличаются по своим свойствам от исходных веществ и, обладая более высокой активностью, нежели крупные молекулы, могут оказывать токсическое воздействие на клетки животных и человека. Показано, что препараты наночастиц – полиоксометаллаты (ПОМ), относящиеся к классу металл–оксидных кластеров, могут подвергаться различным модификациям, что делает их перспективными для создания антивирусных и противоопухолевых препаратов [1, 2, 3]. Наиболее интересными в этом аспекте являются ПОМ на основе молибдена, вольфрама, ванадия, ниобия и тантала. Однако, несмотря на то, что эти ПОМ являются наиболее изученными, нельзя утверждать, что в настоящее время их влияние на живые объекты уже полностью известны [4, 5].

В связи с этим представляло интерес сравнить влияние 4-х препаратов ПОМ, содержащих вольфрам и молибден, на морфофункциональные характеристики культивируемых нормальных клеток человека.

Материал и методы

Препараты наночастиц. В работе были использованы стерильные водные растворы полиоксиметаллатов:

А – H₃PW₁₂O₄₀ – 0.01 М/мл

B – H₃PMo₁₂O₄₀ – 0.01 М/мл

С – H₄SiW₁₂O₄₀ – 0.01 М/мл

Д – H₄SiMo₁₂O₄₀ – 0.01 М/мл

Культуры клеток и питательные среды.

Для экспериментов была выбрана из Коллекции культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского линия ФЭЧ–Т нормальных фибробластов эмбриона человека. Для культивирования клеток использовали стандартную питательную среду Игла производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) фирмы «ПанЭко».

Клетки рассевали на 96-луночную панель фирмы «Costar» (США) в концентрации 200 тыс.кл/мл в каждую лунку в объёме 100 мкл среды с 10% ЭТС и культивировали в CO₂инкубаторе при 37°С. Через 24 ч после посадки клеток в лунки вносили по 100 мкл изучаемого препарата в заданных разведениях. Эксперименты выполняли с тремя повторами. Контролем служили интактные клетки, культивируемые параллельно с опытными.

Для изучения цитотоксического действия наночастиц ПОМ на клетки линии ФЭЧ [6, 7]. применяли МТТ-тестирование Этот основан способности метод на митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ живых, метаболически активных клеток восстанавливать бесцветный водорастворимый МТТ-реагент до голубого формазана, который кристаллизуется 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 культуре, что позволяет оценить гибель клеток, вызванную тем или иным цитотоксическим препаратом.

После культивирования клеток с препаратом наночастиц в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C культуральную среду из лунок отбирали, добавляли по 100 мкл среды с 20 мкл МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-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 в живых клетках кристаллов формазана. Осадок клеток ресуспендировали в течение 5 мин пипетированием. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора формазана, измеряя его оптическую плотность при длине волны 545 нм на спектрофотометре Immunochem 2100 (США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, «Statistica 6,0». Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости р < 0,05.

Трансмиссионная электронная микроскопия.

Изучение влияния препаратов наночастиц на морфологию культивируемых фибробластов после инкубации клеток с препаратами в течение 48 ч проводили с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии. Использовали общепринятую методику фиксирования материала в 2,5 % глютаральдегиде и 1% водном растворе OsO₄, обезвоживания, пропитки И заливки В эпоксидную СМОЛУ. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Полученные контрольные и опытные препараты изучали под электронным микроскопом JEOL 100XC с ускоряющим напряжением 80 кB.

Растровая электронная микроскопия (РЭМ).

С помощью растровой электронной микроскопии предполагалось получить ответ на вопрос о месте локализации наночастиц на поверхности или внутри клеток. Клетки исследовали через 48 ч после сокультивирования с препаратами ПОМ. Покровные стёкла с клетками фиксировали по стандартной методике в 2,5 % глютаральдегиде, промывали в 0,2 М фосфатном буфере, дегидрировали в серии спиртов и высушивали.

При использовании РЭМ поверхность исследуемого образца сканируют электронным пучком с помощью электронной пушки, отраженные от поверхности вторичные электроны воспринимаются детектором. Затем в соответствии с интенсивностью и положением полученных детектором вторичных электронов восстанавливается трехмерное изображение поверхности объекта в черно-белых градациях, при этом яркость оттенка характеризует свойства электропроводности изучаемого материала: высокая электропроводность соответствует более светлым участкам, а низкая – более темным [8, 9]. Изображения были получены на электронном микроскопе JEOL JSM-6490 LV с использованием ускоряющего напряжения 3 кВ.

Изучение продукции цитокинов.

Продукцию цитокинов изучали на уровне их транскрипции *in vitro* после инкубации клеток с препаратами ПОМ в течение 24 ч. Клетки помещали в 6-луночные панели в посевной дозе 200 тыс.кл/мл, инкубировали 24 ч до образования монослоя, и затем после смены среды в лунки вносились препараты в разведениях 1/10,1/20,1/100,1/500. Экспрессия генов интерлейкинов ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, фактора некроза опухолей ФНО-α, интерферонов ИФН-а, ИФН-β, ИФН-у, ИФН-λ1, ИФН-λ2, ИФН-λ3 оценивалась по активности их

70

мРНК. Определение активности мРНК цитокинов в клетках проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). В качестве положительного контроля использовали β-актин. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758) [10–13].

Результаты и обсуждение

При отборе перспективных для фармакологии образцов ПОМ необходимо выбирать из них наименее токсичные для нормальных клеток человека. Количественная оценка цитотоксичности используемых в работе препаратов наночастиц была выполнена с помощью МТТ-тестирования. Получены спектрофотометрические данные показателей оптической плотности растворов формазана в опытах и в контроле. Эти данные позволяют оценить гибель клеток, вызванную тем или иным цитотоксическим агентом. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1.

ПРЕПАРАТ		Показатели оптической плотности при длине волны 545 нм								
A		Разведения препаратов								
ПРЕПАРАТ А В С Д Контроль	1\2	1\4	1\8	1\16	1\32	1\64	1\128	1\256	1\512	1\1024
	0.047	0.052	0.052	0.569	0.715	0.762	0.808	0.862	0.891	0.913
	±0.021	±0.00	±0.01	±0.03	±0.04	±0.09	±0.11	±0.03	±0.02	±0.01
	0.054	0.06	0.053	0.664	0.785	0.833	0.810	0.826	0.866	0.868
В	±0.009	±0.00	±0.00	±0.02	±0.03	±0.02	±0.01	±0.02	±0.04	±0.08
	0.032	0.073	0.076	0.697	0.879	0,945	0.966	0.99	0.97	0.988
С	±0.006	±0.01	±	±0.04	±0.05	±0.05	±0.02	±0.01	±0.03	±0.08
			0.019							
	0.035	0.039	0.143	0.828	0.965	0.966	0.968	0.972	0.955	0.969
Д	±0.0035	±0.01	±0.01	±0.06	±0.02	±0.05	±0.03	±0.00	±0.05	±0.04
Контроль					0.91±0	0.09				

Определение цитотоксичности препаратов ПОМ на клетках ФЭЧ с помощью МТТ-теста.

Полученные с помощью МТТ-теста данные свидетельствуют о том, что 4 исследуемых препарата ПОМ при воздействии на клетки в течение 24 ч вызывают достоверное уменьшение пролиферативной активности и жизнеспособности нормальных клеток человека ФЭЧ-Т только в разведениях 1/2–1/8, а препарат А токсичен еще и в разведении 1/16. Эти

разведения соответствуют концентрациям препаратов от 625 до 5000 мкМ/мл. Все остальные данные, приведенные в таблице, достоверно не отличаются от контроля.

Наибольшая цитотоксичность через 24 ч выявлена у препарата A (H₃PW₁₂O₄₀) содержащего атомы вольфрама, наименьшая – у препарата Д (H₄SiMo₁₂O₄₀) с атомами молибдена, что может свидетельствовать о зависимости степени воздействия ПОМ на клетки от физико-химических свойств тестируемых препаратов.

В сравнении с ранее изученными металлическими наночастицами (окислов меди и железа) и стабилизированных крахмалом наночастиц серебра цитотоксический эффект у всех исследуемых нами полиоксиметаллатов был гораздо ниже [14,15]. Важно подчеркнуть, что цитотоксичность на клетках ФЭЧ всех 4 изучаемых нами препаратов ПОМ через 24 ч инкубации также была ниже, чем токсичность в МТТ-тесте аналогичного, обладающего антивирусной активностью на клетках МДСК, препарата ПОМ-4960 [16].

При изучении электронных микрофотографий клеток в контроле в их цитоплазме были выявлены расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрии, лизосомы, небольшое количество фагосом, липидные включения и внутриклеточные вакуоли различной величины (рис.1). Плазматическая мембрана клеток ФЭЧ образовывала многочисленные складки и редкие микроворсинки. Ядра клеток ФЭЧ были вытянутой овальной формы. Конденсированный хроматин располагался под внутренней мембраной кариолеммы, а неконденсированный хроматин – диффузно в середине ядра.



Рис. 1. Электронная микрофотография цитоплазмы клетки культуры ФЭЧ. Контроль. х 25000



Рис. 2. Электронная микрофотография клетки культуры ФЭЧ, сокультивированной с полиоксометаллатом (В). Ядро извитой формы, в цитоплазме многочисленные вакуоли и аутофагосомы. x 25000

Для ультраструктуры клеток линии ФЭЧ, сокультивированных в течение 48 часов с ПОМ (В) в разведении 1/32 было характерно увеличение количества и размеров вакуолей в цитоплазме и появление в ней множества аутофагосом. Ядра некоторых клеток приобретали извитую форму (рис. 2).

Исследования ультратонких срезов клеток культуры ФЭЧ, в таких же условиях сокультивированных с ПОМ (С) в разведении 1/16, выявили резкое ухудшение состояния клеток: в цитоплазме обнаружены многочисленные скопления вакуолей типа аутофагосом, наблюдалась деструкция мембран ЭПР, клазматоз; ядра большинства клеток стали извитой формы. Некоторые клетки подверглись полному разрушению (рис. 3).



Рис. 3. Электронная микрофотография. Ультратонкий срез цитоплазмы клетки культуры ФЭЧ, сокультивированной с полиоксометаллатом (С). Видны многочисленные вакуоли, клазматоз цитоплазматической мембраны клетки. x 25000

При изучении ультратонких срезов клеток культуры ФЭЧ, сокультивированных с ПОМ (Д) в разведении 1/16, также была выявлена полная деструкция и деградация клеток, в которых разрушены ядра и мембранные структуры цитоплазмы (рис. 4).



Рис.4 Электронная микрофотография. Ультратонкий срез цитоплазмы клеток культуры ФЭЧ, сокультивированных с полиоксиметаллатом (Д). Полная деструкция клеток ФЭЧ. х 25000

При этом с помощью растровой электронной микроскопии монослоя клеток ФЭЧ после 48-ми часовой инкубации с образцами ПОМ в разведении 1/100 (0,0001 М/мл) было показано, что в контрольном образце очень плотный монослой состоял из вытянутых клеток, связанных между собой отростками. В образцах с препаратами ПОМ количество клеток было гораздо меньше, чем в контроле, плазмолемма изменена, разорваны связи между клетками (рис. 5, рис. 6).





Рис. 5. РЭМ-фотография. Клетки, сокультивированные с ПОМ (В), слева и контроль клеток справа. Масштаб шкалы: 100 мкм.



Рис. 6. РЭМ – фотография. Клетки, сокультивированные с ПОМ (А и В), и контроль клеток по порядку. Масштаб шкалы – 10 мкм.

В данном случае необходимо отметить, что поиск и визуализация частиц ПОМ на поверхности или внутри клеток является комплексной и нетривиальной задачей. На сегодняшний день известно, что используемые наночастицы имеют размеры около 1 нм. Поэтому, даже если предполагаемый рельеф поверхности подложки имеет толщину в несколько ангстрем, столь малые частицы было бы очень сложно обнаружить на фоне «молекулярного шума». Он создается присутствующими на поверхности монослоя клеток остатками питательной среды, молекулами аминокислот, белков и других продуктов метаболизма клеток, имеющихми размеры в диапазоне от 10 нм до 1 мкм. При помощи РЭМ исследования не удалось однозначно зарегистрировать положение частиц ПОМ. Предположительно, они могут находиться под слоем биологической пленки, состоящей из остатков органических материалов.

В дальнейшем предполагается в целях повышения эффективности детектирования ПОМ внутри клеток проведение исследований с помощью рентгеновской дифракции. Этот метод позволит получить спектрограмму и выявить закономерные пики дифракции для частиц ПОМ [17]. Однако для определения их положения необходимо будет зарегистрировать спектрограмму и топографию поверхности в каждой точке для создания 4-х-мерной карты поверхности, для чего может быть также использована микро-Рамановская спектроскопия [18].

Исследования синтеза цитокинов в клетках ФЭЧ на уровне их транскрипции *in vitro* уже через 24 ч после введения 4-х ПОМ в разведениях 1/100–1/500 в культуральную среду показали, что исследуемые препараты способствовали активации транскрипции ИФН-γ, ИЛ-18, ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНО-α, а также способствовали активации экспрессии генов интерферонов I, II, III типов (ИФН-α/β, ИФН-γ, ИФН-λ (табл. 2, рис. 7).

	Экспрессия генов ц	итокинов в клетках	ФЭЧ-Т под действ	ием ПОМ
--	--------------------	--------------------	------------------	---------

ПОМ	Наличие (+) /отсутствие (-) мРНК цитокинов в клетках ФЭЧ-Т								
	ИΦΗ-α	ИΦΗ-β	ИФН-ү	ΝΦΗ-λ	ИЛ-1β	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-18	ΦΗΟ-α
H3PW12O40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H4SiW12O40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H4SiMo12O40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H3PMo12O40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Контроль клеток без ПОМ	-	-	-	-	-	-	+	-	-

A - H3PW12040



Рис. 7. Экспрессия генов цитокинов в клетках ФЭЧ-Т под действием ПОМ. Фотография - гель документирования.

Активация данных цитокинов, обуславливающих развитие клеточного иммунитета и макрофагального звена иммунитета в организме, является важным при инфекционных и неврологических заболеваниях, а генов интерферонов, как первого барьера для инфекций.

Поскольку все препараты ПОМ активировали экспрессию гена фактора некроза опухолей ФНО-а, который участвует в противоопухолевом и противовирусном иммунитете, а в отношении ряда опухолей обладает также цитостатическим и цитолитическим эффектом,

возможно, что исследуемые нами ПОМ будут эффективны и для лечения или доставки лекарств при злокачественных новообразованиях.

Кроме того, в опытах *in vitro* в малых (субтоксических) концентрациях исследуемые ПОМ способствовали активации синтеза ИФН-β и угнетению ИЛ-10 – одного из противовоспалительных цитокинов, играющего ключевую роль в развитии аутоиммунных заболеваний и являющегося негативным прогностическим признаком при таких аутоиммунных заболеваниях, как рассеянный склероз и пр. Возможно, данные ПОМ могут быть применены и в данных случаях.

Таким образом, полученные в опытах *in vitro* на нормальных клетках ФЭЧ-Т результаты, показали, что разработка препаратов на основе обладающих иммуномодулирующей активностью ПОМ в субтоксических концентрациях перспективна для использования их как в моно-, так и в комплексной терапии вирусных, аутоиммунных, неврологических и онкологических заболеваний. Из изученных нами 4-х препаратов ПОМ наиболее перспективным для создания антивирусных и противоопухолевых препаратов может быть препарат H₄SiMo₁₂O₄₀ в концентрациях 625–5000 мкМ/мл.

Список литературы

1. Rhule J.T., Hill C.L., Judd D.A., Schinazi, R.F. Polyoxometalates in medicine. Chem.Rev. 1998, 98: 327–358.

2. Shigeta S., Mori S., Yamase T., Yamamoto T. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. Biomed. Pharmacother 2006, 60: 211–219.

3. Yanagie H., Ogata A., Mitsui S., Hisa T, Yamase T, Eriguchi M. Anticancer activity of polyoxomolybdate. Biomed. Pharmacother 2006, 60: 349–352.

4. Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Прокофьева А.В. Исследование хронической токсичности молибденовых и железомолибденовых нанокластерных полиоксометаллатов. Уральский медицинский журнал, 2011, 11(89): 75–79.

5. Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Данилова И.Г., Прокофьева А.В., Морозова М.В. Оценка безопасности железо-молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов, предназначенных для адресной доставки лекарственных веществ. Вестник уральской академической медицинской науки, 2011, 2 (34):107–110.

6. **Харбиев Р.У.** Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.:Медицина. 2005, 832 с.

7. Подчерняева Р.Я., Суетина И.А., Михайлова Г.Р., Лопатина О.А., Бобринецкий И.И., Морозов Р.А., Селезнев А.С. Культивирование перевиваемых клеточных линий на подложках из углеродных нанотрубок и влияние электростимуляции на пролиферацию клеток. Вопросы вирусологии. 2012, 57, (5): 46–48.

8. Braet F., Seynaeve C., de Zanger R., Wisse E. Imaging surface and submembranous structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages. Journal of microscopy. 1998, 190, (3): 328–338.

9. Braet F, de Zanger R, Seynaeve C, Baekeland M, Wisse E. A comparative atomic force microscopy study on living skin fibroblasts and liver endothelial cells. J Electron Microsc. 2001, 50: 283–290.

10. **Chomezynski P., Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinum thyocyoanate-phenol-chloroform extraction.Anal.Biochem.1987,162: 156–159.

11. Gelder C.M., Thomas P.S., Yates D.H., Adcock I.M., Morrison J.F.J., Barnes P. Cytokine expression in normal, atopic and asthmatic subject using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction. Thorax, 1995, 50:1033–1037.

12. Lin Y., Zhang M., Barnes P.F. Chemokine production by human alveolar epithelial cell line in response by Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immunity. 1998, 66 (3): 1121–1126.

13. Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Firsova E.L., Gushhina E.A. Effect of Singlewalled Carbone Nanotubes on Biological Properties of the cell Cultures of Human Embryonic Fibroblasts. 3rd International Scientific and Practical Conference "Science and Society" ISPC, 2013, 3: 175–184.

14. Суетина И.А., Подчерняева Р.Я., Гущина Е.А., Лопатина О.А., Поклонов В.А., Остроумов С.А. Использование клеточных технологий для оценки токсичности наночастиц окислов металлов. Фармацевтические и медицинские биотехнологии, Материалы международной научно практической конференции М.: Экспо-биохим-технологии, РХГУ им. Д.И.Менделеева. 2013: 134–135.

15. Сосенкова Л.С., Егорова Е.М., Подчерняева Р.Я., Суетина И.А. Наночастицы серебра, стабилизированные крахмалом: синтез и взаимодействие с клетками in vitro. Нанотехнологии и охрана здоровья. 2013, 5,1(14): 10–13.

16. Hosseini S.M., Amini E., Kheiri M.T., Mehrbod P., Shahidi M., Zabihi M. Anti-influenza Activity of a Novel Polyoxometalate Derivative (POM-4960). Int. J.Mol. Cell Med. Winter 2012, 1, (1): 21–29.

17. Crans, D.C., Mahroof-Tahir, M., Anderson, O.P., Miller M.M. X-ray Structure of (NH4) 6 (Gly-Gly) 2V10O28. cntdot. 4H2O: Model Studies for Polyoxometalate-Protein Interactions. Inorganic Chemistry. 1994, 33, (24): 558–65590.

18. Fournier M., Thouvenot R., Rocchiccioli-Deltcheff C. Catalysis by polyoxometalates. Part 1.—Supported polyoxoanions of the Keggin structure: spectroscopic study (IR, Raman, UV) of solutions used for impregnation Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions. 1991, 87, (2): 349–356.