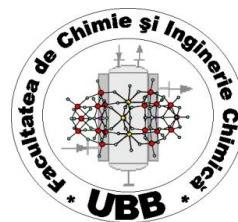




**UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
CLUJ-NAPOCA**
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
Școala Doctorală de Chimie



**SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR
POLIOXOMETALAȚI CU POSIBILE
APLICAȚII BIOLOGICE**

Conducător Științific:

Prof. Dr. Mariana Rusu

Doctorand:

Silvia-Ștefana Bâlici

**CLUJ-NAPOCA
2015**

Comisia de doctorat pentru doamna Silvia-Ştefana Ş. Bâlici

Preşedinte:

Profesor univ. Dr. Anca Silvestru

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică,
Universitatea “Babeş-Bolyai”, Cluj-Napoca

Conducător de doctorat:

Profesor univ. Dr. Mariana Rusu

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică,
Universitatea “Babeş-Bolyai”, Cluj-Napoca

Referenți:

Profesor univ. Dr. Andreea Ioana Stănilă

Facultatea de Știința și Tehnologia Alimentelor
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca

Profesor univ. Dr. Mircea-Nicolae Palamaru

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Universitatea “Alexandru Ioan Cuza”, Iași

Profesor univ. Dr. Adrian Pătruț

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Universitatea “Babeş-Bolyai”, Cluj-Napoca

CUPRINS	3
INTRODUCERE	5
OBIECTIVE	8
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	8
Capitolul 1. Aspecte teoretice în studiul polioxometalaților	8
1.1. Structura polioxometalaților	8
1.2. Clasificarea polioxometalaților	9
Capitolul 2. Sinteza și caracterizarea polioxometalaților – stadiul actual al cercetării	15
2.1. Metode generale de sinteză a polioxometalaților	15
2.2. Caracterizarea fizico-chimică a polioxometalaților – metode de analiză	21
Capitolul 3. Aplicațiile polioxometalaților și importanța lor	23
Capitolul 4. Polioxometalații – nanocompuși biologic-activi cu aplicații medicale multiple	24
4.1. Pătrunderea în celule a polioxometalaților	25
4.2. Activitatea antibacteriană a polioxometalaților	26
4.3. Activitatea antivirală a polioxometalaților	30
4.4. Activitatea antitumorală a polioxometalaților	32
4.5. Activitatea anticoagulantă a polioxometalaților	36
4.6. Activitatea hipoglicemiantă a polioxometalaților	37
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	39
Introducere – strategii de sinteză și de caracterizare a polioxometalaților cu aplicații biologice	39
Capitolul 1. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a polioxometalaților cu structuri saturate și lacunare	42
1.1. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a polioxometalaților cu structuri saturate	42
1.2. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a polioxometalaților cu structuri lacunare	45
1.2.1. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a POMs cu structuri Keggin monolacunare cu adenzi identici	45
1.2.2. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a POMs cu structuri Keggin monolacunare cu adenzi amestecați	61
1.2.3. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a POMs cu structuri Keggin trilacunare	68
1.2.4. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a POMs cu structuri Keggin și pseudo-Keggin trilacunare de tip sandwich	70
1.2.5. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a POMs pseudo-Keggin unor structuri trilacunare de tip sandwich aparținând seriei BiW9	83
1.2.6. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a POMs cu structuri monolacunare Wells-Dawson cu adenzi amestecați	87
Capitolul 2. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor clusteri cu posibile aplicații biologice	88
2.1. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor clusteri cu fragmente organice și organometalice	93
2.2. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor clusteri cu ioni ai metalelor f	101
Capitolul 3. Caracterizarea activității biologice a polioxometalaților sintetizați	109
3.1. Activitatea hipoglicemiantă a doi polioxometalați – studii <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i>	109
3.1.1. Introducere	109
3.1.2. Materiale și metode	110
3.1.3. Rezultate și discuții	116
3.1.3.1. Activitatea hipoglicemiantă la șobolani cu diabet indus cu streptozotocină	117
3.1.3.2. Diferențierea celulelor stem în celule β-pancreatice, producătoare de insulină	127
3.1.4. Concluzii	134

3.2. Activitatea antibacteriană a polioxometalaților sintetizați – studii <i>in vitro</i>	135
3.2.1. Introducere	135
3.2.2. Materiale și metode	137
3.2.3. Rezultate și discuții	142
3.2.4. Concluzii	155
3.3. Activitatea antitumorală a polioxometalaților sintetizați – studii <i>in vitro</i>	157
3.3.1. Introducere	157
3.3.2. Materiale și metode	158
3.3.3. Rezultate și discuții	160
3.3.3.1. Determinarea activității antitumorale a heteropolioxomolibdaților	160
3.3.3.2. Determinarea activității antitumorale a heteropolioxowolframaților	169
3.3.4. Concluzii	187
CONCLUZII GENERALE	189
BIBLIOGRAFIE	194
ANEXE	208
ANEXA 1. Lista abrevierilor	208
ANEXA 2. Spectrele UV-VIS și FT-IR ale polioxometalaților saturați și lacunari sintetizați	211
ANEXA 3. Spectrele UV-VIS, FT-IR și RMN ale clusterilor sintetizați	224
ANEXA 4. Imagini obținute prin TEM ale nanocompușilor și ale celulelor β -pancreatice Imagini de microscopie în contrast de fază ale celulelor stem mezenchimale umane din membrana amniotică	229
ANEXA 5. Imagini obținute prin microscopie fonică care redau activitatea antibacteriană a polioxometalaților	236
ANEXA 6. Activitatea științifică	246

Sinteza lucrării:

50 polioxometalați (POMs), incluzând 7 compuși originali, 40 sintetizați după metode din literatură și 3 de proveniență comercială, au fost caracterizați fizico-chimic apelând la tehnicile de absorbție atomică, analiză termică, spectroscopie UV-Vis, FT-IR, RES și RMN, respectiv microscopie electronică de transmisie. Au fost studiate activitățile biologice hipoglicemiantă, antibacteriană și antitumorală. Prin studii *in vivo* și *in vitro*, am demonstrat că doi POMs cu W testați în tratamentul șobolanilor cu diabet indus de streptozotocină și pentru stimularea diferențierii celulelor stem mezenchimale în celule producătoare de insulină au realizat efecte hipoglicemiant prin două mecanisme concomitente, prevenind apoptoza celulelor pancreatice β și stimulând diferențierea celulelor stem din pancreas în celule noi producătoare de insulină. Activitatea antibacteriană a 37 POMs a fost investigată comparativ cu nouă antibiotice clasice pe specii bacteriene Gram-pozitive și Gram-negativ, 20 POMs prezentând activitate antibacteriană semnificativă la concentrațiile testate. Activitățile antitumorale ale 9 POMs cu Mo și 18 cu W au fost investigate *in vitro* pe liniile celulare HUVEC și HeLa, efectele fiind diferite: toți POMs cu Mo și 9 cu W au avut efecte citotoxice asupra celor două linii prin inițierea apoptozei, alți 7 POMs cu W nu au influențat proliferarea celulară, iar 2 compuși au stimulat-o.

Cuvinte cheie:

polioxometalați, wolfram, vanadiu, molibden, sinteze, activitate antibacteriană, diabet, celule beta pancreatice, celule stem, activitate antitumorală

INTRODUCERE

Dezvoltarea unor noi compuși inovatori, non-toxici cu efecte antitumorale, antivirale, antibacteriene și antidiabetice eficiente poate oferi o abordare alternativă la tratamentele clasice ale cancerului, ale bolilor infecțioase sau ale diabetului, unele dintre cele mai grave amenințări la adresa sănătății umane. Datorită proprietăților lor fizico-chimice unice, compușii anorganici de tip clusteri metal-oxidici cu sarcină negativă mare modelați prin derivatizare sau funcționalizare sunt adecvați pentru sinteza ulterioară a unor medicamente cu proprietăți biologice țintite. Polioxometalații (POMs) sunt considerați nanomateriale inteligente întrucât aceste agregate oligomerice se formează prin procese de auto-asamblare, cunoscute ca fiind cele mai ieftine procese de sinteză și aparținând „Chimiei verzi”.

Aplicațiile lor biomedicale au fost dezvoltate mai intens în ultimele decenii, având la bază particularitatea că modelarea oricărei proprietăți moleculare a polioxometalaților (schimbarea polarității, modificarea ușoară a potențialelor redox și a distribuțiilor de sarcină pe suprafață, de formă sau aciditate) contribuie decisiv la recunoașterea macromoleculelor țintă ale diferitelor substraturi biologice (normale/patologice) și la reactivitatea acestor macromolecule (proteine, ADN, ARN etc.) sub acțiunea polioxometalaților. Posibilitățile de nanomanipulare și de realizare a unor sinteze complexe prin procese de autoasamblare sau biomimetice deschise de noile tehnologii disponibile au făcut ca acest domeniu să fie unul dintre cele mai active în domeniile cercetării științifice și tehnologice.

Aceste perspective sunt fundamentul abordării din prezenta teză de doctorat.

Rezultatele prezentate aici au fost obținute după cum urmează:

- sintezele și unele caracterizări fizico-chimice ale polioxometalaților s-au realizat în cadrul Departamentului de Chimie – Chimie Anorganică a Facultății de Chimie și Inginerie Chimică a Universității „Babeș-Bolyai”, Cluj-Napoca;
- caracterizarea fizico-chimică a unor polioxometalați s-a efectuat în colaborare cu Departamentul 2 la Disciplina Chimie-Fizică și la Disciplina Chimie Generală și Anorganică a Facultății de Farmacie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, și în colaborare cu Institutul de Chimie „Raluca Ripan”;
- caracterizarea relației structură moleculară-activitate biologică s-a realizat în colaborare cu mai multe unități de cercetare din Cluj-Napoca, astfel:

- *determinarea activității antibacteriene* a compușilor sintetizați s-a realizat în colaborare cu două departamente: Departamentul III Paraclinic la Disciplina Microbiologie, Imunologie și Epidemiologie, Departamentul IV Învățământ Clinic cu Disciplina Reproducție, Obstetrică și Patologia Reproducției și cu Disciplina Boli Infecțioase și Medicină Preventivă ale Facultății de Medicină Veterinară a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară;
- *determinarea activității antitumorale* (studii *in vitro*) s-a realizat în colaborare cu Laboratorul de Radiobiologie și Biologie Tumorală, Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță”;
- *determinarea activității antidiabetice* a doi polioxometalați s-a realizat astfel:
 - studiul *in vivo*: în cadrul Departamentului 3 – Științe Moleculare la Disciplina Biologie Celulară și Moleculară și în Laboratorul de Microscopie Electronică din cadrul disciplinei, Facultatea de Medicină a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, cu participarea și a Asist. Dr. Modeste Wankeu-Nya de la Catedra de Fiziologia Animalelor și Fitofarmacie, Facultatea de Științe a Universității din Douala, Camerun;
 - studiul *in vitro*: s-a realizat în colaborare cu Laboratorul de Radiobiologie și Biologie Tumorală, Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță”.

Rezultatele prezentate în lucrare au fost publicate, comunicate sau sunt în curs de publicare.

Motivarea alegerii temei

Teza de doctorat contribuie la dezvoltarea cunoașterii într-un domeniu de actualitate atât pe plan național cât și internațional, domeniu cu o dinamică exponențială, având în vedere necesitatea creării unor noi nanocompuși cu aplicații în: medicină, energie, cataliză, știința materialelor, etc.

Ca urmare, s-a impus dezvoltarea unei strategii de sinteză pentru obținerea facilă a acestora în vederea propunerii de noi formule farmaceutice și relativ ieftine, și care ar contribui fundamental la îmbunătățirea și creșterea calității vieții. Pentru atingerea acestui deziderat s-au realizat sintezele unor nanocompuși – polioxometalați cu structuri arhetipale care stau la baza arhitecturilor formate prin auto-asamblare, având ulterior ca finalitate stabilirea relației structură chimică – activitate biologică. S-a căutat atingerea acestui obiectiv major pentru a se evita în timp repetarea unor pași în cercetarea avansată din acest domeniu, al chimiei polioxometalaților.

OBIECTIVE

Pentru atingerea dezideratelor propuse s-au efectuat: **1.** sintezele (prin metode cunoscute din literatură și prin modificarea acestora) mai multor tipuri de polioxometalați, astfel s-au sintetizat compuși cu structuri: saturate Keggin și *pseudo*-Keggin de tip sandwich, cu structuri lacunare (monolacunare cu adenzi identici și micști, și trilacunare), Wells-Dawson, Anderson, și a unor clusteri; **2.** caracterizarea fizico-chimică a tuturor compușilor sintetizați: stabilirea compoziției chimice (analiza elementală), stabilirea structurii chimice prin metode spectroscopice (UV-Vis, FT-IR, RMN), stabilitatea în soluție apoasă la pH fiziologic, analize termogravimetrice; **3.** stabilirea activității antibacteriene, antitumorale și hipoglicemiante a polioxometalaților sintetizați (studii comparative); **4.** descrierea și stabilirea relației structură chimică-activitate biologică în vederea optimizării metodelor de sinteză ale acestor nanocompuși și implicit a modelării structurii lor pentru obținerea unui răspuns maxim de la substratele biologice țintă.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Capitolul 1. Aspecte teoretice în studiul polioxometalaților – structura și clasificarea lor

Polioxometalații (POMs), au fost descoperiți cu peste 200 de ani în urmă [1] de către Scheele (1727) și Berzelius (1826), iar Marignac în 1862 a stabilit compoziția acestora [2]. În urma studiilor făcute de Pauling pe cristalele unor complecși, Keggin a stabilit prima structură a acestora prin difracție de raze X [3-5]. Polioxometalații sunt compuși coordinativi de tipul clusterilor metal-oxigenici, cu formula reprezentativă $[X_xM_mO_y]^{q-}$; $x < m$ [6, 7], formați prin policondensarea unor oxoanioni ai metalelor tranziționale din grupele 5 și 6 (atomi adenzi) – uzual Mo, W, și V, și mult mai rar Nb, Cr și Ta, în stare înaltă de oxidare (configurație electronică d^0 și d^1) cu oxoanioni ai unor metale sau nemetale (heteroatomi primari) [7-9].

După compoziția lor chimică polioxometalații pot fi: izopolioxometalați (fără heteroatom în constituția lor) – și care conțin numai atomi adenzi alături de O și H; și heteropolioxometalați, care conțin pe lângă atomii de oxigen, hidrogen, și atomii adenzi și alți atomi în structura lor numiți heteroatomi – cum ar fi cele peste 70 de elemente din Sistemul Periodic [2, 6-8].

O formulă generală care stă la baza structurii lor poate fi redată simplu: $[H_aX_xZ_zM_mM_n^*O_yL_lH_h^*]^{p-}$, unde $x < m$ și: H – atom de hidrogen ionizabil; X – heteroatom primar (element aflat într-o proporție mai mică și în stare de oxidare pozitivă; pot fi majoritatea elementelor din Sistemul Periodic cu excepția gazelor rare și a halogenilor); Z – heteroatom secundar; M – primul atom adend (metal

tranzițional aflat într-o proporție atomică mai mare și în stare de oxidare pozitivă superioară; și care este coordonat octaedric de către atomi de oxigen); M^* – al doilea atom adend; O – atom de oxigen; L – ligand diferit de ionul oxid O^{2-} (liganzi coordinați de heteroatomul secundar, cum ar fi: H_2O , N_3^- , O_2 , NO, NH_3 , NSC^- , ș.a.); H^* – atom de hidrogen de constituție [7, 8].

Capitolul 2. Sinteza și caracterizarea polioxometalaților – stadiul actual al cercetării

Mecanismele de reacție pentru formarea polioxometalaților sunt complexe și în timpul sintezelor au loc procese de reorganizare, aceasta îngreunând practic uneori desfășurarea reacției chimice urmărite, cea de formare a noilor compuși. Metodele de sinteză cele mai simple și cunoscute sunt: sinteza din componente, sinteza pornind de la alți polioxoanioni, sinteza indirectă ș.a. [8].

Parametrii determinanți ai sintezei structurilor polioxometalice, precum și a sintezei unor ansambluri arhitecturale mari sunt: pH-ul, temperatura favorabilă desfășurării reacțiilor, modul de realizare al sintezei (în condiții de reflux, hidrotermale, sau sub acțiunea microundelor), tipul și concentrația anionilor metal-oxigenici, prezența/absența unui anumit tip de heteroatom și concentrația acestuia în soluție, forța ionică, prezența agenților de reducere, natura solventului (organic/anorganic), prezența/absența altor adenzi [2, 23].

Sinteza „all in one-pot” are loc într-un singur pas sau într-un număr mic de pași, este cea mai simplă metodă de sinteză și constă în acidularea unei soluții apoase (arhitectura speciei compusului format este pH dependentă, figura I.2.1.) de oxomolibdat sau de oxowolfram. Astfel în timp ce valoarea pH-ului soluției scade crește nuclearitatea fragmentelor oxoanionice, cu mențiunea că oxovanadații se obțin la un pH ridicat.

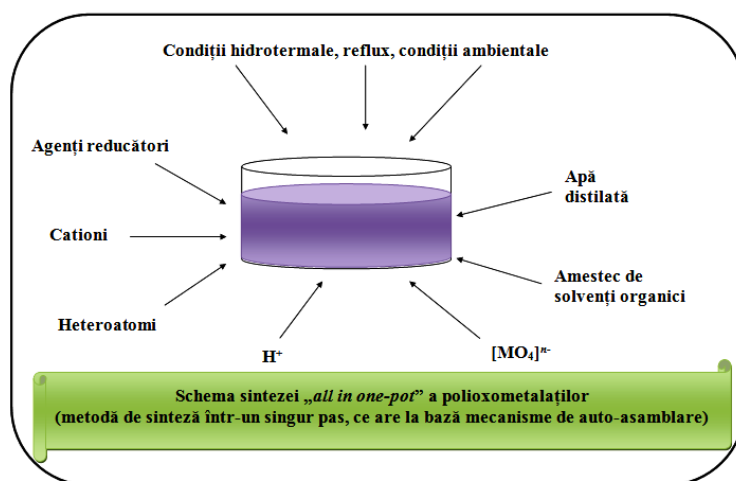


Fig. I.2.1. Schema sintezei „all in one-pot” [modificată după 23].

Caracterizarea fizico-chimică a polioxometalaților – metode de analiză

Pentru a determina condițiile optime de sinteză a polioxometalaților (POM) în soluție și pentru a caracteriza speciile chimice din punct de vedere al structurii lor moleculare, cele mai utilizate metode sunt metodele colorimetrice, metodele spectrofotometrice, metodele conductometrice și metodele polarografice [8]. Metodele fizice pentru caracterizarea compușilor chimici ca polioxometalații, printre care: metodele care au la bază interacțiunea radiației luminoase cu substanța, metode optice ca: refractometria, colorimetria, spectrofotometria – spectrometria în domeniul ultraviolet și vizibil (UV-Vis) (stabilirea spectrelor electronice, cu maxime dependente de structura heteropolianionului), spectrometria de microunde (stabilirea spectrelor de rotație); spectrometria în IR, FT-IR (spectrometria în infraroșu cu transformată Fourier, stabilirea spectrelor de vibrație) și metode care au la bază comportarea substanțelor în câmpuri electrice, ca măsurătorile de dipolmoment; metode care se bazează pe comportarea substanțelor în câmp magnetic: măsurători de susceptibilitate magnetică, spectrometria de rezonanță electronică de spin – RES [21], spectrometria de rezonanță magnetică nucleară – RMN și care oferă date despre structura polioxoanionilor și dinamica lor în anumite medii, despre fenomene de relaxare care au loc, despre modificările chimice care pot apărea, cea mai precisă și rapidă metodă fiind spectroscopia RMN multinucleară (multinuclear NMR spectroscopy) [24-31]. Studiile cristalografice sunt cele mai performante metode de analiză cunoscute. Acestea au la bază difracția razelor X ce conduce la stabilirea structurii într-un mod mult mai exact, descifrarea celulei elementare a polioxometalaților, având ca finalitate și stabilirea rețelei cristaline [53-55].

Capitolul 3. Aplicațiile polioxometalaților și importanța lor

În capitolul 3 sunt descrise succint aplicațiile POMs pe baza interacțiunilor moleculare, aplicații redate în figura I.3.2.

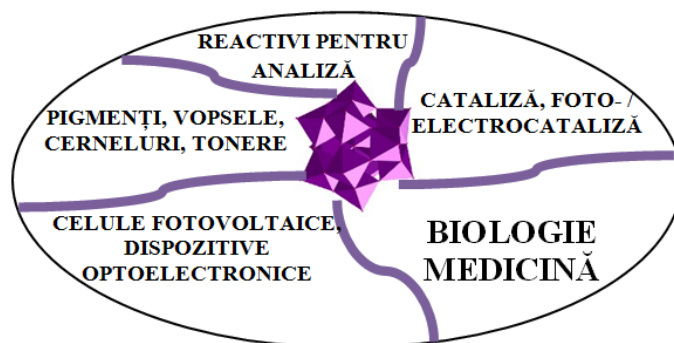


Fig. I.3.2. Aplicațiile polioxometalaților.

Capitolul 4. Polioxometalații – nanocompuși biologic-activi cu aplicații medicale multiple

În ceea ce privește posibile aplicații medicale, heteropolioxometalații sunt mai eficienți decât izopolioxometalații în ceea ce privește activitatea biologică, din cauza versatilității lor ce permit schimbări structurale în timpul proceselor de sinteze. Compatibilitatea biologică este cea mai mare provocare, mai ales că aceștia sunt substanțe anorganice ceea ce constituie un dezavantaj. Cu toate acestea, modificări ale proprietăților lor moleculare (potențiale redox, distribuție de sarcină electrică, aciditate), funcționalizare, asamblare selectivă controlată cinetic, stabilizare în medii apoase și derivatizare pot intensifica compatibilitatea acestora cu mediul biologic la un pH fiziologic [62]. Acțiunile lor cele mai importante biologice cu posibile aplicații în medicină sunt cele antibacteriene, antivirale și antitumorale și au fost evidențiate în timpul studiilor de cercetare aplicată.

Deși mai multe studii au demonstrat în mod clar capacitatea unor heteropolioxoanioni să pătrundă prin membranele celulare, mecanismul molecular complex este încă enigmatic.

Activitatea antibacteriană a polioxometalaților a fost demonstrată pe un număr mare de tulpini rezistente la diverse antibiotice. Diverse studii (Tajima și Yamase în special) au raportat anumite activități antibacteriene ale polioxometalaților combinați cu antibioticele β -lactamice, teste realizate împotriva unor specii ca *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus metilino-rezistent (MRSA)*, *vancomicino-rezistent la metilina (VRSA)*, *Helicobacter pylori* sau *Bacillus subtilis* [72-80]. Mai recent au fost demonstrate acțiunea heteropolioxometalaților împotriva prionilor [84].

Încă din 1971, a fost observată activitatea antivirală a polioxometalaților asupra virusurilor ca MLSV (virusul sarcomului murin leucemiei), VSV (virusul stomatitei veziculoase), virusul polio, virusul rubeolei, RLV (virusul leucemiei Rauscher), RV (virusul rabiei), rhabdovirus sau EBV (EBV - virusul Epstein-Barr) [94-102]. Rezultate promițătoare dau polioxometalaților o șansă de luptă împotriva HIV, HBV, a unor virusuri herpetice (HSV-1, HSV-2, HCMV), și împotriva unor virusuri gripale agresive [102, 103]. Numeroase studii au arătat că transcriptaza inversă a virusului HIV-1 (HIV-1 RT) este inhibată selectiv de anumiți polioxometalați [100]. Deoarece nu interacționează direct cu virusurile în organismele gazdă, acțiunea principală este antivirală, și nu virucidă, și depinde de mărime, încărcare, structura, de compoziția polioxoanionilor, precum și de tipul de virus (ADN, ARN) împotriva cărora au fost testați [72]. Au fost descrise și acțiuni anticoagulante ale acestor compuși datorită gradului de hidratare al POMs [123-125]. Mecanismele antitumorale ale acțiunii POMs nu sunt bine înțelese, singurul studiu uman *in vivo* în 1965 raporta blocarea cu succes a evoluției carcinomului de vezică urinară după tratarea cu POMs în combinație cu cofeina [106].

Studiile *in vitro* asupra celulelor maligne au relevat că activitatea antitumorală a polioxometalaților este superioară unor medicamente citostatice [107-109]. S-a observat că activitatea antitumorală este influențată de forma anionului din complex, în timp ce contracționul determină biodisponibilitatea acestuia. Polioxometalații inhibând generarea de ATP, reduc activitatea mitocondriilor și activează apoptoza. Mecanismul propus de Yamase în 1994 are la bază o reacție redox [8]. Polioxometalații au dovedit a prezenta o mare specificitate împotriva protein-kinazei CK2, un agent anti-apoptotic global [110-115]. În anii 80 un număr de experimente *in vivo* folosind streptozotocină sau alloxan stabilit activitatea hipoglicemiantă a unor compuși cu vanadiu, dar au indicat o toxicitate ridicată [149-152]. Vanadil sulfatul este folosit ca un supliment în nutriție și testat din 2000 în studiile clinice cu rezultate promițătoare și fără efecte secundare semnificative [145-148]. Studii suplimentare s-au concentrat pe compuși de wolfram și molibden, pentru a le reduce toxicitatea în timp și a crește activitatea hipoglicemiantă. Acesta a fost stabilit că vanadiu îmbunătățește acțiunea insulinei, dar mecanismele reale sunt încă în curs de dezbatere [149-152]. Grupul lui Nomiya a rămas până în anul 2014 singurul care a publicat rezultate în acest domeniu al tratării diabetului indus experimental cu STZ la șoareci de laborator, tratament cu polioxowolframați substituiți cu ioni vanadil [153].

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

S-au caracterizat 50 de compuși, din care 40 sintetizați prin diferite metode adaptate după cele descrise în literatura de specialitate, iar 7 sunt compuși noi. Aceștia sunt enumerați mai jos.

1. $(\text{NH}_4)_4[\text{NBu}_4]_5[\text{Na}(\text{BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ (POM 2 D=POM BI-28)
2. $\text{Na}_8[\text{La}_2(\text{H}_2\text{O})_6(\text{Bi}_2\text{W}_{20}\text{O}_{70})] \cdot 37\text{H}_2\text{O}$ (POM T-8)
3. $\text{Na}_{15}[(\text{CeO})_3(\text{H}_2\text{O})_2(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 48\text{H}_2\text{O}$ (POM T-10)
4. $\text{K}_6[\text{SiVW}_{11}\text{O}_{40}] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (POM BI-30)
5. $\text{K}_6[\text{Si}(\text{VO})\text{Mo}_2\text{W}_9\text{O}_{39}] \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ (POM BI-7)
6. $\text{Na}_5[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})\text{GeW}_{11}\text{O}_{39}] \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ (POM BI-24a,b=POM T-26)
7. $\text{Na}_{14}[\text{Mn}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{SiW}_9\text{O}_{34})_2] \cdot 28\text{H}_2\text{O}$ (POM BI-27=POM T-11).

Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a $(\text{NH}_4)_4[\text{NBu}_4]_5[\text{Na}(\text{BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$.

Complexul $(\text{NH}_4)_4(\text{NBu}_4)_5[\text{Na}(\text{BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ (POM2 D=POM BI-28), cu o formulă inedită propusă, specifică sintezei unui POM mai mare, derivat cu fragmente organometalice, a fost preparat și caracterizat în premieră, astfel:

La o soluție 0.66 mL (conținând 3.3 mmoli) de $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{SnCl}_3$ în 50 mL apă bidistilată și deionizată s-a adăugat repede și sub agitare continuă la 50-60°C 1 mmol (6.94 g) din pulberea ligandului $(\text{NH}_4)_{17}\text{Na}[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$. În câteva secunde, cea mai mare parte a criptatului Sb_9W_{21} s-a dizolvat și soluția a devenit limpede la un pH final de 5.0. Urmele de ligand nereacționat au fost eliminate prin filtrare după 10 minute, apoi filtratului i s-au adăugat în cantități mici 2.7 mmoli (1 g) de $(\text{NBu}_4)\text{Br}$, obținându-se un precipitat alb. Acesta a fost apoi colectat pe o pânză cu frită fină, uscat sub vid timp de 1 h, și spălat ulterior cu soluție saturată de $(\text{NBu}_4)\text{Br}$. S-a lăsat la uscat sub vid peste noapte, obținându-se 3.60 g (cu un randament de 39%). Pentru purificare pulberea albă a acestui compus s-a spălat cu etanol și în final s-a obținut o cantitate de 2.94 g (cu un randament final de 31%).

Ionii BuSn^{3+} au reacționat în soluție apoasă cu $[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]^{18-}$ (L2) conform reacției:



Produsul final a fost izolat sub formă de sare mixtă de amoniu și tetrabutil-amoniu, cu un randament bun, în conformitate cu următoarea ecuație:



Criptatul (complexul) polioxometalic ca ligand pentavacant a fost funcționalizat cu unii cationi ai metalelor tranziționale și de noi cu fragmente organometalice [80].

Analiza elementală a POM2 $(\text{NH}_4)_4(\text{NBu}_4)_5[\text{Na}(\text{BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ a validat formula propusă. Calcule teoretice pentru $\text{C}_{92}\text{H}_{257}\text{N}_9\text{NaSb}_9\text{Sn}_3\text{W}_{21}\text{O}_{103}$ ($M=8473.62$): C 13.04; H 3.06; N 1.49; Na 0.27; Sb 12.93; Sn 4.20; W 45.56; H_2O 3.61. Rezultate experimentale: C 13.06; H 3.10; N 1.54; Na 0.28; Sb 12.94; Sn 4.35; W 45.61; H_2O 3.64. Analiza termică a nanocompusului POM2 a relevat prezența a 17 molecule de apă de cristalizare (rețea).

Aspectul cel mai interesant în formarea acestui compus a fost interacțiunea dintre BuSn^{3+} și $[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]^{18-}$ printr-o auto-asamblare ciclică a anionilor $(\text{B-}\beta\text{-Sb}_9\text{W}_7\text{O}_{24})^{3-}$ legați de două fragmente externe Sb_3O_7 cu formarea complexului $[\text{Na}(\text{BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]^9$. Produsul reacției în soluție apoasă dintre ionii $[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]^{18-}$ și BuSn^{3+} , izolat sub formă de sare mixtă de amoniu și tetrabutil-amoniu, s-a dovedit a fi $(\text{NH}_4)_4(\text{NBu}_4)_5[\text{Na}(\text{BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$, în care anionul

B- β -[NaSb₉W₂₁O₈₆]¹⁸⁻ a fost legat prin punți O-Sn-O. Anionul de polioxowolframic a fost constituit dintr-un fragment B- β -[NaSb₉W₂₁O₈₆] (L2), care lega trei fragmente BuSn³⁺ în trei liganzi pentavacanți prin cinci atomi de oxigen terminali și astfel toți ionii de staniu aveau câte un n-butil terminal, rezultând o geometrie cu coordinare octaedrică. Acest anion (POM2) a fost primul derivat (pentru prima dată raportat) al anionului B- β -[NaSb₉W₂₁O₈₆]¹⁸⁻ și cationi de butilstaniu. Anionul wolframoantimonat (III) [NaSb₉W₂₁O₈₆]¹⁸⁻ conținea trei grupări {SbW₇O₂₄} legate de un miez central format din două grupări {Sb₃O₇} încapsulând un cation de sodiu, formând situsul activ central. Unitățile {SbW₇O₂₄} erau derivați lacunari pentavacanți ai ipoteticului anion Keggin { β -SbW₁₂}, rezultat prin îndepărtarea a cinci octaedre WO₆ (un triplet W₃O₁₃ și câte un octaedru din două triplete diferite), formând alte șase situsuri active dispuse câte două spre cele trei subunități {SbW₇O₂₄}. Două site-uri lacunare adiacente pe fiecare grup {SbW₇O₂₄} ar putea fi ocupate cu unul sau doi cationi tranziționali pentru a forma nanocomplecși [81,82]. Toate aceste aspecte sunt redată în figura II.2.11.

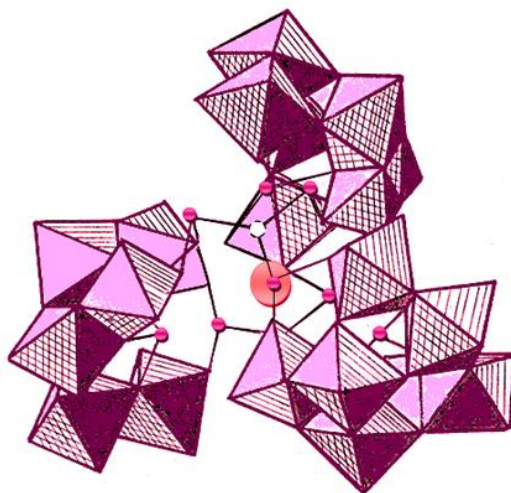


Fig. II.2.1. Structura polianionului B- β -[NaSb₉W₂₁O₈₆]¹⁸⁻, reprezentarea poliedrică a celor trei fragmente {SbW₇}: poliedrele WO₆ în mov, bilă albă atomul de O, bile roz atomii de Sb, și bila mai mare orange cationul Na⁺ [modificată după Zhang, 1995].

Analizele termice au relevat următoarele aspecte. Primul proces important a fost pierderea în greutate, însoțită de două efecte endoterme la temperaturi cuprinse în intervalul 40-240°C. Aceasta a corespuns eliminării a 17 molecule de apă (3.61%), în fapt pierderea apei de cristalizare în două etape. Următorul proces important, observat la 200-350°C, a fost legat de modificările în arhitectura polioxoanionului, comparativ cu alți polioxometalați. Peste 380°C, după arderea componentelor organice, reziduurile anorganice au prezentat unele efecte exoterme minore, probabil din cauza unei transformări polimorfe.

Spectrele electronice UV ale HPA-23 ca ligand al lui POM2 (diabet, POM BI-28) au prezentat două benzi de transfer de sarcină (figura II.2.2 și prezentate în tabelul II.2.1), aspect caracteristic în structurile polioxometalice.

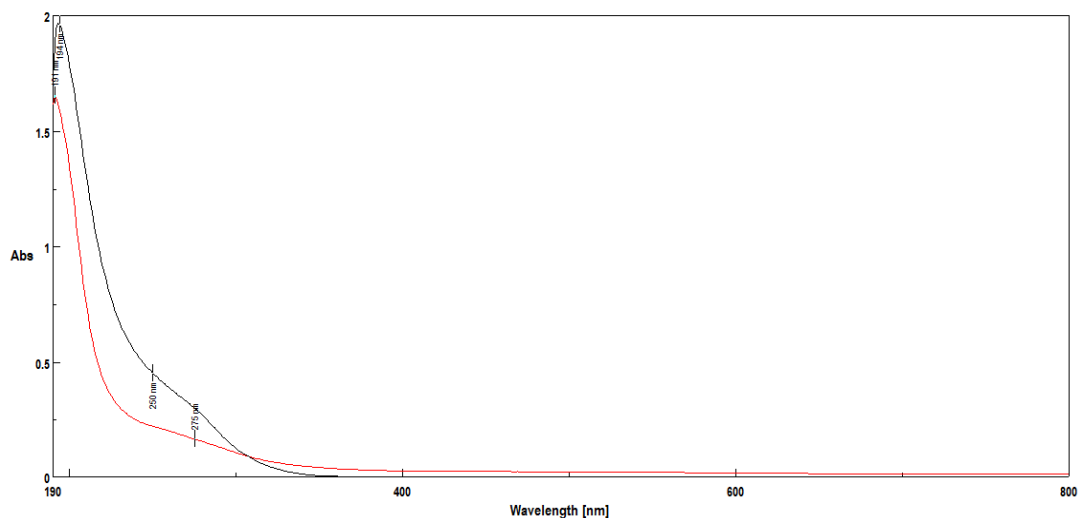


Fig. II.2.2. Spectrele electronice în UV ale POM2=POM BI-28 (în roșu) și ale ligandului HPA-23 (L2, în negru).

Tabel II.2.1. Deplasările chimice în spectrele UV ale L2 și POM2 (nm/cm⁻¹).

	$\nu_2 (W=O_t)$	$\nu_1 (W-O_{c,e}-W)$
L2-HPA23	194 nm/51546 cm ⁻¹	250 nm/40000 cm ⁻¹
POM2=POM BI-28	191 nm/52356 cm ⁻¹	275 nm/36363 cm ⁻¹

O_i este un oxigen intern care leagă atomii de Sb și W; $O_{c,e}$ sunt atomii de oxigen care leagă colțurile și muchiile comune ale octaedrului WO_6 , iar O_t este un oxigen terminal.

Spectrele UV ale L2 și POM2 au fost foarte asemănătoare, evidențiind că transferul de sarcină în interiorul structurii polioxowolframului nu a fost afectat în mod semnificativ de coordinare. Banda mai intensă, corespunzând tranziției $p_\pi(O_t) \rightarrow d_\pi(W)$, a fost centrată la 51546 cm⁻¹ (194 nm) în L2 și la 52356 cm⁻¹ (191 nm) în POM2. Acest lucru a fost în acord cu coordinarea ionilor metalici de către atomii de oxigen terminali ai ligandului pentavacant L2. Banda largă centrată la 40000 cm⁻¹ (250 nm) în spectrul L2 corespundea tranziției transferului de sarcină $p_\pi(O_{c,e}) \rightarrow d_{\pi^*}(W)$ în benzile tricentrice W-O_{c,e}-W. Această bandă a fost mult mai deplasată spre energii mai joase în cazul POM2, la 36363 cm⁻¹ (275 nm). Acest lucru a fost în acord cu intensificarea neechivalenței acestor legături, prezentând în final și o scădere a simetriei datorită distorsionării octaedrelor WO_6 corespunzătoare.

Spectrele vibraționale. Toți POMs preparați și liganzii corespunzători lor au benzi spectrale IR caracteristice în intervalul $700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ [83]. Spectrele FT-IR ale polioxometalaților arată, în general, contribuțiile fragmentelor la structurile finale ale polioxoanionilor [84-87].

Aceste benzi au fost deplasate în comparație cu polioxometalații lacunari din cauza schimbărilor structurale cauzate de coordinarea fragmentelor organometalice (butilstaniu) din POM2. Spectrul FT-IR al noului nanocomplex $(\text{NH}_4)_4(\text{NBU}_4)_5[\text{Na}(\text{BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ (POM2), prin comparație cu spectrul $(\text{NH}_4)_{17}\text{Na}[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ (L2) (figura II.2.3), a oferit informații privind coordinarea ionilor BuSn^{3+} de către diferitele tipuri de atomi de oxigen în structura POM2. După cum am presupus, L2 și POM2 au redat benzile spectrale IR caracteristice pentru polioxometalați (tabelul II.2.2).

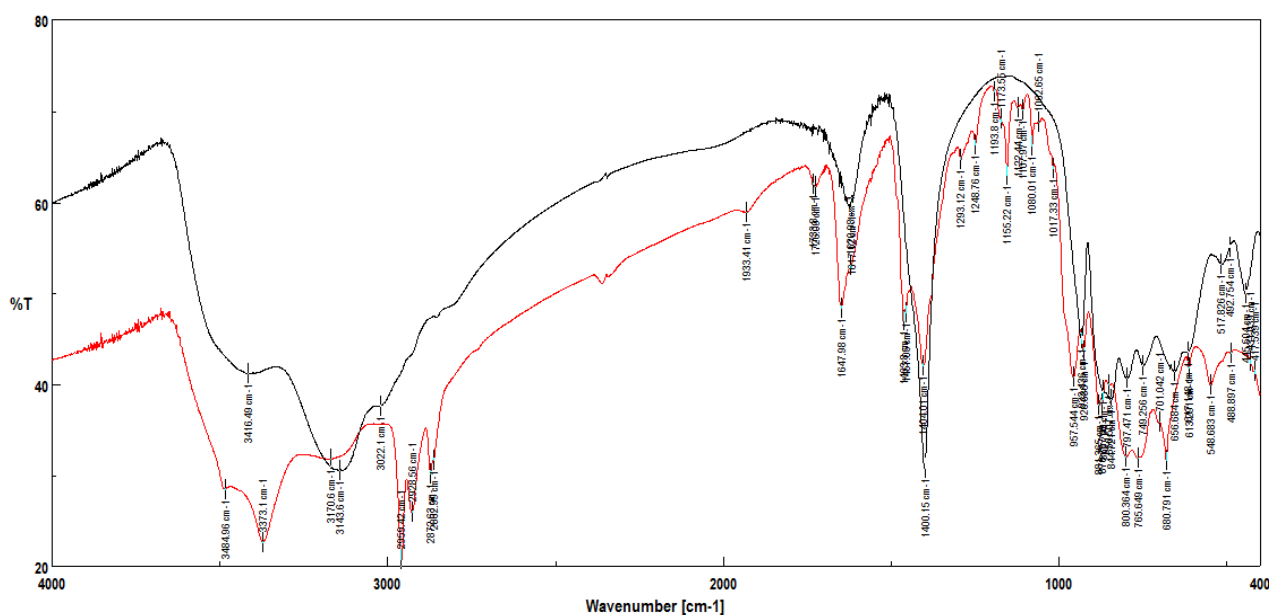


Fig. II.2.3. Spectrele FT-IR ale POM2=POM BI-28 (în roșu) și ale ligandului HPA-23 (L2, în negru).

Table II.2.2. Numerele de undă (cm⁻¹) din spectrele FT-IR ale L2 și POM2.

Atribuire	L2	POM2
$\nu_{\text{as}}(\text{W}=\text{O}_t)$	933s	958s, 927m
$\nu_{\text{as}}(\text{W}-\text{O}_c-\text{W})$	870s, 845s	881s, 871s, 851s
$\nu_{\text{as}}(\text{W}-\text{O}_e-\text{W})$	797vs, 749vs	800vs, 766vs
$\nu_{\text{as}}(\text{Sb}-\text{O}_i)$	657s, 518w	681s, 613m, 549s
$\nu_{\text{as}}(\text{Sn}-\text{O})$	-	681s, 549s
$\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{Sn}-\text{O})$	-	681s, 549s
$\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{Sn})$	-	489m, 418m
$\nu(\text{C}-\text{N})$	-	1293m, 701 sh
$\nu_{\text{as}}(\text{O}-\text{H})$ din H ₂ O	3416s	3485s, 3373vs
$\nu_{\text{as}}(\text{N}-\text{H})$ din NH ₄ ⁺	3144vs, 3022sh	3171m, b
$\delta(\text{W}-\text{O}-\text{W})$	493w	489vw
$\delta(\text{Sb}-\text{O})$	446m	431w
$\delta(\text{O}-\text{H})$ din H ₂ O	1617m	1648m, 1621sh
$\delta(\text{N}-\text{H})$ din NH ₄ ⁺	1400vs	1404s
$\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{H})$ din fragmentele BuSn	-	1000-1300, 1700-1950, >2800

Spectrele RMN.

Spectrele RMN ¹H și ¹³C au indicat echivalența tuturor fragmentelor de butilstaniu. Din păcate, până în prezent nu am putut obține spectre de înaltă calitate. Acest lucru s-a datorat solubilității foarte scăzute a compușilor în solventul utilizat (CDCl₃) [94]. Cu toate acestea, spectrele RMN ¹H și ¹³C ale *n*-BuSnCl₃ și POM2 au avut o alură similară și au prezentat rezonanțele așteptate. Ele au arătat, de asemenea, patru semnale caracteristice grupul butil, dar aceste semnale (în POM2) au fost relativ deplasate în comparație cu *n*-BuSnCl₃ (ca standard de referință) [95], aceste valori sunt redată în tabelul II.2.3. Comparativ spectrele ¹H-RMN ale (NH₄)₄(NBu₄)₅[Na(BuSn)₃Sb₉W₂₁O₈₆]·17H₂O și trichlorurii de butilstaniu libere au fost aproape identice, ceea ce s-ar putea datora fie constantei de legare slabe, fie schimbului rapid al fragmentelor de butilstaniu (ca timpi de rezonanță RMN). În plus, datorită caracterului diamagnetic al W(VI), deplasările în urma complexării au fost ușor diferite [95, 96]. În spectrul ¹H-RMN al POM2 deplasările chimice (δ, ppm) ale semnalelor de rezonanță erau centrate la 2.05 (multiplet, CH₂,α), 1.85 (quintet, CH₂,β), 1.42 (sextuplet, CH₂,γ) și respectiv 0.88 (triplet, CH₃,δ) față de *n*-BuSnCl₃ (2.41; 1.90; 1.50 și 0.98 ppm) în regiunea alifatică. Spectrul ¹H-RMN nu a fost foarte bine rezolvat, dar toate rezonanțele au putut fi atribuite, totuși alura spectrului a sugerat existența unei singure specii chimice, și anume POM2. Semnalelor date de atomii de carbon în spectrele ¹³C-RMN au arătat că deplasările chimice sunt în corelație cu natura grupărilor butilstaniu și cu noua legătură C-Sn-O [95] în structura POM2. Semnalele de rezonanță

ale POM2 în spectrele ^{13}C -RMN au fost ușor deplasate la 32.04 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2,\alpha$); 27.83 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2,\beta$); 26.22 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2,\gamma$) și 13.51 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}_3,\delta$) comparativ cu $n\text{-BuSnCl}_3$ (33.54; 26.93; 25.74 și 13.44 ppm), ceea ce este în concordanță cu coordinarea atomilor de staniu legați de atomii de oxigen terminali din octaedrele WO_6 . Spectrul ^{13}C -RMN al POM2 în CDCl_3 a prezentat rezonanțele anticipate pentru atomii de carbon alifatici și a arătat patru linii clare, confirmând puritatea și natura unui singur de produs rezultat în sinteză.

Table II.2.3. Deplasările semnalelor de rezonanță (δ , ppm) în spectrele ^1H -NMR și ^{13}C -NMR ale $n\text{-BuSnCl}_3$ (referință) și POM2.

Spectrul ^1H -NMR	$n\text{-BuSnCl}_3$	POM2=POM BI-28
$\underline{\text{C}}\text{H}_2,\alpha$	2.41	2.05
$\underline{\text{C}}\text{H}_2,\beta$	1.90	1.85
$\underline{\text{C}}\text{H}_2,\gamma$	1.50	1.42
$\underline{\text{C}}\text{H}_3,\delta$	0.98	0.88
Spectrul ^{13}C -NMR	$n\text{-BuSnCl}_3$	POM2=POM BI-28
$\underline{\text{C}}\text{H}_2,\alpha$	33.54	32.04
$\underline{\text{C}}\text{H}_2,\beta$	26.93	27.83
$\underline{\text{C}}\text{H}_2,\gamma$	25.74	26.22
$\underline{\text{C}}\text{H}_3,\delta$	13.44	13.51



Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a $\text{Na}_8[\text{La}_2(\text{H}_2\text{O})_6(\text{Bi}_2\text{W}_{20}\text{O}_{70})]\cdot 37\text{H}_2\text{O}$.

Această sinteză s-a realizat în soluție apoasă prin metoda amestecului din componente, în mediu acid, în conformitate cu stoichiometria reacțiilor chimice care au loc. Compusul a fost caracterizat prin mai multe metode fizico-chimice. Două subunități BiW_9 ale heteropolioxoanionilor formați în timpul sintezei captează într-un sandwich două octaedre WO_6 și încă doi cationi La^{3+} rezultând o structură Bi_2W_{20} cu o simetrie C_{2h} (având un centru de inversie), redată și propusă pentru compus în figura II.2.15.

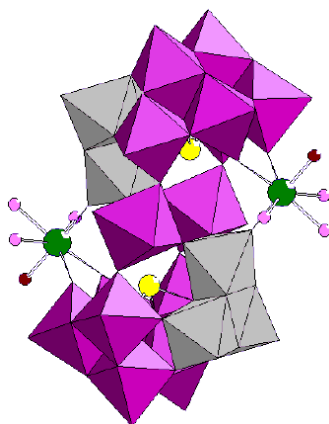


Fig. II.2.15. Reprezentarea poliedrică a polioxoanionului $[\text{La}_2(\text{H}_2\text{O})_6(\text{Bi}_2\text{W}_{20}\text{O}_{70})]^{8-}$. (în mov sunt octaedrele WO_6 , în gri octaedrele WO_6 rotite cu 60° , cu bile verzi ionii La^{3+} , cu bile galbene heteroatomii de Bi, bile roz moleculele de apă de coordinare, și cu bile roșii atomii de oxigen).

Ioni lantanidici în această structură sunt heptacoordinați, într-o bipiramidă pentagonală ca geometrie. Astfel de structuri se pot auto-asambla în dimeri și pot forma straturi monodimensionale.

Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a $\text{Na}_{15}[(\text{CeO})_3(\text{H}_2\text{O})_2(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 48\text{H}_2\text{O}$

Această sinteză s-a realizat în soluție apoasă prin metoda amestecului din componente, în mediu acid, în conformitate cu stoichiometria reacțiilor chimice care au loc și modificând metoda dată de Gouzerh în 2002. Compusul a fost caracterizat prin mai multe metode fizico-chimice.

Structurile de tip sandwich care au încorporat ioni metalici f au fost descrise de Knoth. Propunem pentru acest compus sintetizat $[(\text{CeO})_3(\text{H}_2\text{O})_2(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]^{15-}$ structura redată în figura figura II.2.19.

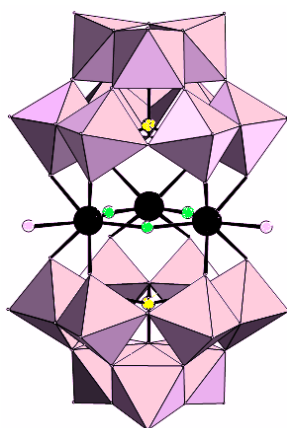


Fig. II.2.19. Reprezentare poliedrică a structurii polioxometalului $[(\text{CeO})_3(\text{H}_2\text{O})_2(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]^{15-}$ (în mov octaedrele WO_6 , bile negre atomii de Ce, bile galbene atomii de Bi din structura sandwich, bile verzi atomii de oxigen, bile roz moleculele de apă).

Capitolul 3. Caracterizarea activității biologice a polioxometalaților sintetizați

3. 1. Activitatea hipoglicemiantă a doi polioxometalați – studii *in vitro* și *in vivo*

Introducere

Două grupuri de cercetători, printre care și cel condus de Nomiya, au caracterizat anumiți polioxometalați ca fiind molecule insulino-mimetice și care au activitate hipoglicemiantă [153].

În studiul de față prezintă rezultatele obținute în urma investigațiilor privitoare la activitatea hipoglicemiantă a doi heteropolioxowolframați care nu au fost cercetați din această perspectivă, POM BI-10 = POM T-7 = POM1 D = $\text{K}_{11}\text{H}[(\text{VO})_3(\text{SbW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 27\text{H}_2\text{O}$ = PM-1002 (descriș pentru prima

dată în literatură de Yamase și colaboratorii, 2001) și POM BI-28=POM2 $D=(NH_4)_4(NBu_4)_5[Na(BuSn)_3Sb_9W_{21}O_{86}] \cdot 17H_2O$ propus pentru prima dată aici în prezenta teză, s-au dovedit a avea acțiune hipoglicemiantă.

Efectele hipogliceminate ale celor doi polioxometalați au fost stabilite într-un studiu *in vivo* în urma administrării lor orale la șobolani cu diabet indus cu STZ (streptozotocină). În vederea elucidării mecanismului molecular de acțiune al polioxometalaților, experimentele *in vitro* au arătat capacitatea celor doi POMs de a stimula diferențierea celulelor stem în celule producătoare și secretoare de insulină.

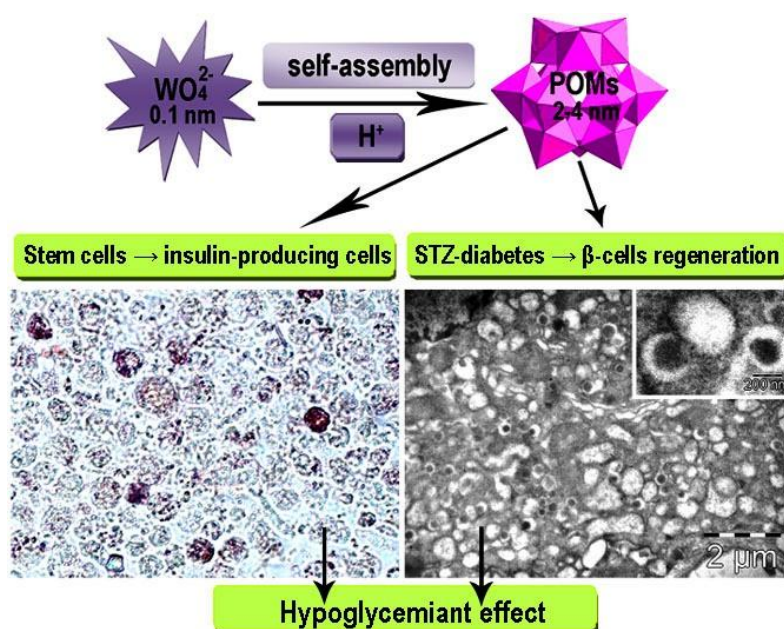


Fig. II.3.1.1. Efectelor hipoglicemiante ale polioxometalaților (rezumat grafic).

Materiale și metode

Studiul *in vivo*. Au fost utilizați șobolani Wistar masculi, la care s-a indus diabetul printr-o injecție intraperitoneală (o singură doză) cu STZ (50 mg/kg corp). S-a colectat sânge prin puncție venoasă de la fiecare șobolan și s-a stabilit nivelul glicemiei folosind un glucometru Accu-Chek® Active (F. Hoffmann, La Roche Diagnostics Ltd.). Șobolani injectați cu STZ și care au avut glicemia mai mare de 200 mg/dL au fost considerați ca fiind diabetici. S-au stabilit patru grupuri de control de șobolani (sănătoși tratați cu apă Millipore, sănătoși tratați cu POM1, respectiv cu POM2, diabetici tratați cu apă Millipore) și două grupuri de șobolani diabetici tratați cu POM1, respectiv cu POM2. Animalele

din toate grupurile tratate cu POMs (concentrația soluțiilor apoase stock a fiecărui POM a fost de 1 mg/mL) au primit zilnic prin gavaj oral o anumită cantitate în funcție de greutatea corporală a fiecărui animal, până la o doză cumulativă de 4 mg/kg corp la finalul celor 3 săptămâni de tratament. Nivelul glucozei în sânge (a jeun) s-a analizat în prima zi, în ziua a-14-a și respectiv în ziua 21 (finalul tratamentului), atunci când șobolani au fost uciși sub anestezie generală. Distribuția și caracteristicile ultrastructurale ale veziculelor secretorii din celulele β ale pancreasului endocrin, celulele producătoare de insulină, precum și evaluarea hepatotoxicității induse de administrarea POMs s-au realizat urmând protocolul standardizat de analiză la microscopul electronic de transmisie (TEM) JEOL JEM 1010 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Diametrele veziculelor secretorii din celulele β și cele ale granulelor electron-dense din interiorul lor au fost măsurate cu ajutorul programului de morfometrie Cell[^]D (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

Studiul *in vitro*. Au fost utilizate în acest studiu trei linii celulare: celule stem mezenchimale adulte umane din măduva osoasă (M-MSCs), celulele umane endoteliale ale venei ombilicale (HUVECs) și celule stem mezenchimale adulte umane din membrana amniotică (A-MSCs). Celulele M-MSCs și A-MSCs au fost cultivate în mediu standard de cultură a celulelor stem, iar celulele HUVEC au fost cultivate în mediu RPMI-1640. Stabilirea citotoxicității POMs s-a realizat prin tehnica MTT pe celulele M-MSCs și pe celulele HUVEC. Diferențierea *in vitro* a celulelor A-MSCs în celule progenitoare insulină s-a efectuat urmând protocolul de diferențiere pancreatică.

Pentru **analiza statistică** și pentru reprezentarea grafică a tuturor rezultatelor a fost utilizat soft-ul GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Diferențele au fost considerate semnificative statistic la o valoare a $p < 0,05$.

Rezultate și discuții

S-au caracterizat cei doi POMs din punct de vedere al dimensiunii lor prin TEM și s-au măsurat manual utilizând softul Cell[^]D (câte 6093 de măsurători pentru fiecare POM) diametrele în vederea stabilirii distribuției dimensiunii lor, aspecte redată în figura II.3.1.2.

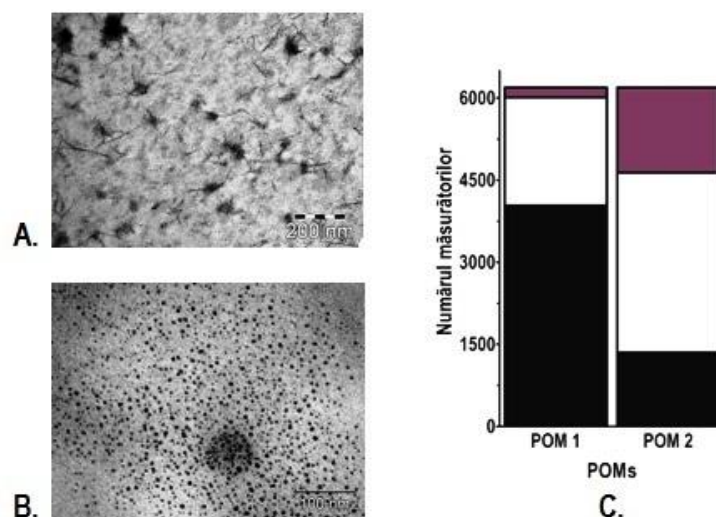


Fig. II.3.1.2. Dimensiunile nanocompușilor. A. imaginea TEM a POM1; B. imaginea TEM a POM2; C. distribuția diametrelor POMs (în negru diametre între 2-3 nm, în alb diametre între 3-4 nm și în mov diametre peste 4 nm).

Efectele POMs asupra greutateii corporale și ingestiei de alimente. Nu s-au observat diferențe semnificative statistice ale diferitelor tratamente aplicate în timpul studiului asupra ingestiei de alimente. În ceea ce privește greutatea corporală, printre animalele control negativ, numai grupul grupul martor de șobolani sănătoși a prezentat constant o evoluție crescătoare. La grupurile tratate cu POMs s-a observat o creștere după 14 zile a greutateii corporale, urmată de o revenire spre sfârșitul studiului. Prin urmare, am presupus că tratamentul cu POMs a fost responsabil de stimularea metabolismului, efect care apoi a fost treptat anihilat în cursul ultimei săptămâni de tratament, cel mai probabil din cauza iritației mucoasei gastrice și intestinale produse de compuși. La toate grupurile de animale diabetice (control pozitiv și cele două grupuri tratate cu POMs), s-a observat o scădere continuă a greutateii pe parcursul întregului experiment.

Efectele hipoglicemiante ale POMs. Glicemia a prezentat valori constante la cele 3 grupe de animale control negativ (netratate și tratate) pe parcursul întregului studiu. La grupul control pozitiv, tratamentul cu STZ a fost urmat de o creștere dramatică a glicemiei, datorită unui număr mare de celule pancreatice β afectate de STZ. La cele două grupuri de animale diabetice tratate cu POM1, respectiv POM2 s-a observat o creștere mult mai puțin pronunțată a glicemiei în comparație cu grupul control pozitiv, pe parcursul dar și la sfârșitul experimentului. Deși nu s-a înregistrat o diferență semnificativă statistic între valorile glicemiei măsurate în ziua 21 la grupul de animale

diabetice tratat cu POM1 în comparație cu cel tratat cu POM2, efectele hipoglicemizante ale POM1 au fost mai accentuate. Toate aceste aspecte sunt redate în figura II.3.1.3.

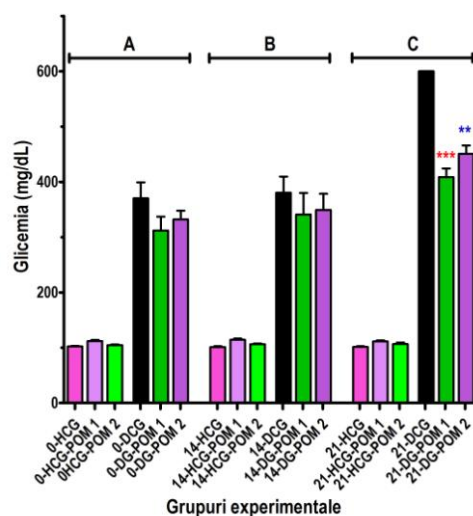


Fig. II.3.1.3. Evoluția glicemiei la șobolanii din toate loturile experimentale. A. ziua 1 de tratament; B. ziua 14 de tratament; C. ziua 21 de tratament.

Aspecte ultrastructurale ale celulelor β -pancreatice.

Principala caracteristică ultrastructurală a acestor celule la grupul șobolanilor sănătoși a constat în prezența a numeroase vezicule secretorii, cu o distribuție normală în interiorul celulelor β . S-a dovedit că metodele de fixare bazate pe glutaraldehidă și tetraoxid de osmiu sunt responsabile pentru „ultrastructura clasică” a veziculelor secretorii din celulele β , prezentând un miez electron-dens (granule de insulină) înconjurat de un mare halo străveziu. Diametrul mediu calculat al veziculelor secretorii din grupul șobolanilor sănătoși a fost de 466.67 ± 58.40 nm, iar diametrul mediu al miezului electron-dens a fost de 264.01 ± 45.29 nm.

În grupurile de șobolani martor cu diabet (control pozitive) au fost găsite multe celule β în apoptoză în insule. Ele erau micșorate și detașate de celulele învecinate, aveau nuclee neregulate, cu clusteri de granule de cromatină și un spațiu perinuclear dilatat, reticul endoplasmic dilatat, precum și o citoplasmă foarte vacuolizată. Cu toate acestea, alte celule β au păstrat o ultrastructură generală normală, cu nuclee eucromatinice rotunzi sau ovali, reticulul endoplasmic rugos cu aspect ultrastructural normal și aparate Golgi proeminente. Pe de altă parte, în citoplasmă s-au observat organisme multilamelare și mitocondriile au fost umflate, cu matrice rarefiată și creste întrerupte. Majoritatea veziculelor secretorii nu prezentau miezul dens de insulină, sau aveau miezuri foarte mici. Numărul de vezicule secretorii cu aspect normal a fost redus semnificativ, cele mai multe

dintre acestea având doar un subțire inel strălucitor în jurul miezului de insulină care ocupa aproape în întregime veziculele secretorii. Unele dintre aceste granule au fost imature, cu o electron-densitate redusă. Diametrul mediu al veziculelor secretorii în acest grup a fost de 273.30 ± 42.88 nm, pentru miezul dens fiind calculat un diametru mediu de 193.84 ± 101.58 nm.

Celulele β din grupul șobolanilor diabetici tratați cu POM1 au arătat nuclee eucromatinice de formă ovală, cu contur neregulat, reticulul endoplasmatic dilatat și aparate Golgi proeminente. Printre veziculele lor secretorii, prezente în număr mare, multe au avut aspect ultrastructural normal, chiar dacă au avut diametre mai mici. Multe alte vezicule observate erau încă lipsite de miez dens, iar unele dintre veziculele goale aveau diametre mai mari. Diametrul mediu al veziculelor secretorii în acest grup a fost de 359.88 ± 67.12 nm, iar pentru miezul dens a fost calculat un diametru mediu de 124.82 ± 111.29 nm.

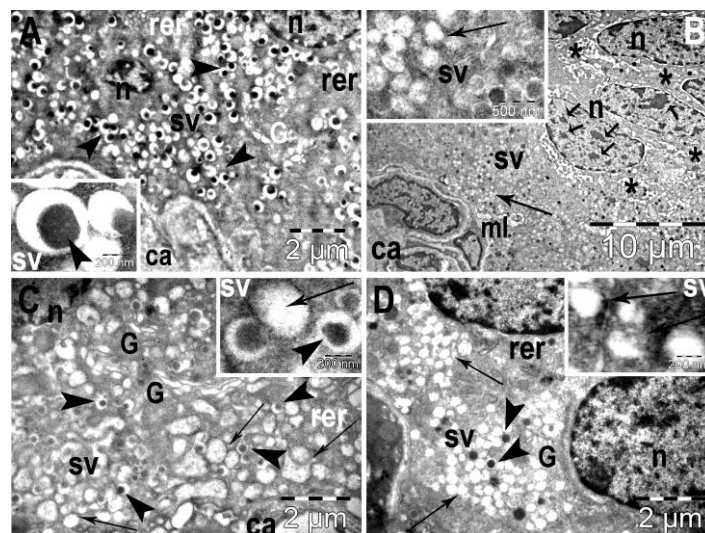


Fig. II.3.1.4. Aspectele ultrastructurale (imagini TEM) ale celulelor β -pancreatice de la diferitele loturi experimentale. A. lot HCG – șobolani sănătoși; B. lot DCG – șobolani cu diabet STZ indus; C. lot DG-POM1 – șobolani diabetici tratați cu POM1; D. Lot DG-POM2 – șobolani diabetici tratați cu POM2.

În grupul șobolanilor diabetici tratați cu POM2, au fost găsite câteva (rar) celule β necrozate. Celulele β rămase intacte au fost în număr mai mare în acest grup comparativ cu grupul control diabet. Veziculele secretorii au fost prezente în număr mare, dar veziculele fără granula centrală electron-densă de insulină au predominat. Rareori veziculele au conținut nuclee mici dense, și chiar mai rar au fost cele cu granule de insulină de dimensiuni normale. Diametrul mediu al veziculelor secretorii din acest grup a fost de 178.05 ± 50.03 nm, iar pentru miezul dens, a fost calculat un diametru mediu de 51.22 ± 71.20 nm.

O corelație evidentă între mărimea medie a veziculelor secretorii (și a miezurilor lor dense) și nivelurile glicemiei a fost observată doar la compararea grupurilor martor (sănătos și diabetic). În grupul tratat cu POM1, celule β individuale au prezentat un model ultrastructural similar cu celulele β ale șobolanilor martor sănătoși. Acest aspect a indicat un grad mare de recuperare a funcțiilor lor secretorii, constatare susținută și de diametrele mai mari ale veziculelor secretorii.

În grupul șobolanilor diabetici tratați cu POM2, celulele β semănau mai mult cu cele din grupul martor de șobolani cu diabet, în principal cu privire la degranulare, aspect care ar putea explica activitatea hipoglicemiantă diferită a celor doi POMs.

Aspecte ultrastructurale ale hepatocitelor. Examinarea imaginilor TEM din grupul de control negativ de șobolani a relevat utrastructura normală a hepatocitelor. În grupul de șobolani martor cu diabet s-au înregistrat modificări ultrastructurale importante ale hepatocitelor. Hepatocitele din grupul șobolanilor diabetici tratați cu POM1 au prezentat ca principale caracteristici ultrastructurale nucleee euchromatinice de formă ovală cu nucleoli proeminenți și contur neregulat, reticulul endoplasmatic dilatat, și mulți lizozomi secundari eterogeni. Ultrastructura hepatocitelor în grupul șobolanilor diabetici tratați cu POM2 a fost foarte asemănătoare cu cea a hepatocitelor din grupul tratat cu POM1, dar un număr mai mic de celule a părut să fie afectat, având nucleee neregulate și lisosomi secundari în număr mare. Aceste constatări ultrastructurale au indicat că POMs (în dozele utilizate aici) au avut capacitatea de a restabili activitatea metabolică deranjată inițial a hepatocitelor la șobolanii diabetici. Rezultatele noastre implică o lipsă a efectului toxic detectabil a celor doi POMs. Aceste aspecte au fost confirmate și prin testele MTT efectuate pe celulele cultivate.

Testarea citotoxicității POMs prin testul MTT

HUVEC aproape că nu au fost afectate de POM1, doar una dintre cele mai mari doze s-a dovedit a avea un efect inhibitor semnificativ (0.11 mg/mL), dar au fost mai sensibile la aproape toate concentrațiile de POM2 testate. POM1 a indus o rată crescută de proliferare a M-MSCs, modificări care au fost statistic semnificative la concentrații de 1,12 și 0,56 $\mu\text{g/mL}$. Efectul POM2 a fost citotoxic la concentrații ridicate de 0,2 și 0,11 mg/mL. Concentrațiile mai mici de 9 $\mu\text{g/mL}$ au determinat și o creștere mai mare a celulelor M-MSCs, dar nu cu aceeași amplitudine ca POM1. Conform acestor rezultate, concentrația de 9 $\mu\text{g/mL}$ pentru POM1 și POM2 (cea mai mare doză care s-a dovedit a fi non-toxică pentru M-MSCs) a fost stabilită și aleasă pentru alte experimente de diferențiere *in vitro*.

Diferențierea celulelor stem pancreatice în celule producătoare de insulină

S-au parcurs trei etape de diferențiere a celulelor stem, în prezența celor doi POMs, respectând protocoalele de diferențiere pe parcursul a 4 săptămâni, și toate testele s-au efectuat în triplicat pentru a urmări reproductibilitatea rezultatelor. S-a demonstrat diferențierea celulelor stem în celule producătoare și secretoare de insulină prin colorarea cu ditizonă, colorant specific pentru marcarea insulinei funcționale (asamblată în hexameri). S-a observat prezența unor numeroase clustere pozitive de ditizonă în toate cele trei probe, dar acestea erau în număr mai mare în A-MSCs tratate cu POMs.

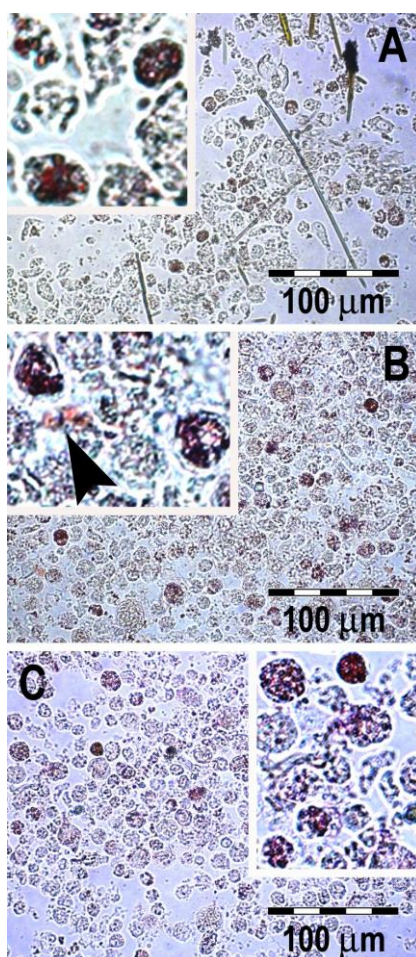


Fig. II.3.1.10. Imagini de microscopie în contrast de fază ale celulelor A-MSCs care se diferențiază în celule pancreatice producătoare și secretoare de insulină. A-C: A-MSCs diferențiate în celule progenitoare pancreatice la sfârșitul procesului de diferențiere, după 6 zile de cultivare cu mediu P3 suplimentat cu glucagon și TGF β 1. A. Control, multe clustere celulare ditizono- pozitive; B. în A-MSCs tratate cu POM1 s-au format mult mai multe clustere celulare ditizono- pozitive; C. tratarea cu POM2 asemenea, a condus la un număr mare de celule ditizono- pozitive. Detalii din A-C: redau clustere celulare care conțin insulină; în B se observă clustere colorate cu ditizonă, și prezența insulinei secretate culoarea roșie în afara clusterelor (marcată cu săgeată).

Aceste rezultate au dovedit capacitatea ambilor POMs de a accelera diferențierea celulelor stem în celule producătoare de insulină. Între cei doi POMs testați, POM1 a fost mai puternic, iar prezența insulinei în interiorul celulelor a fost confirmată de culoarea roșie intensă observată în toate clusterelor celulare. În plus, în cazul ambilor POMs, intensitatea culorii roșii în unele grupuri specifice de celule nu a fost atât de generalizată, dar în apropierea unor astfel de clusterelor un „nor” amorf colorat în roșu a fost remarcat. Acest aspect este chiar mai important decât sinteza eficientă a insulinei de către celulele diferențiate, deoarece a dovedit că aceste celule au nu doar abilitatea de a sintetiza insulina, dar și capacitatea de a secreta insulina produsă.

Concluzii

Cei doi polioxometalați, cu diametrul mediu de 2-4 nm, au arătat o activitate semnificativă hipoglicemiantă, consecutivă tratamentului oral pe un model animal de diabet STZ-indus. Anionul tris-(vanadii)-tungsto-antimoniatul(III) (POM1) testat s-a dovedit a fi mai puternic în toate privințele decât anionul tris-butilstaniu-21-tungsto-9-antimoniatul(III) (POM2). În plus, unul dintre principalele avantaje emergente din acest studiu cu acești nanocompuși a fost reprezentat de toxicitatea lor scăzută, în funcție de doză. Pe baza studiilor *in vivo* și *in vitro*, am ajuns la concluzia că cei doi polioxometalați testați și-au exercitat efectele lor hipoglicemiante prin două mecanisme diferite și concomitente: au prevenit apoptoza celulelor β -pancreatice (și ulterioara reducere a cantității de insulină) și au stimulat diferențierea celulelor stem rezidente în noi celule pancreatice producătoare și secretoare de insulină.

3. 2. Activitatea antibacteriană a polioxometalaților sintetizați – studii *in vitro*

Introducere

Una dintre cele mai interesante aplicații ale polioxometalaților (POMs) este stabilirea activității lor antibacteriene și a comportamentului asemănător cu al antibioticelor. Cunoscută fiind rezistența la antibiotice dobândită de bacterii, descoperirea de noi compuși cu potențial antibacterian puternic este un obiectiv important. În acest subcapitol descriu rezultatele obținute în urma testării activității lor antibacteriene a 37 POMs astfel: 30 de compuși în setul I comparativ cu amoxicilina (antibiotic cu spectru larg) și 7 compuși în setul al II-lea, polioxometalați *pseudo*-Keggin, cu structuri trilacunare „sandwich” (având încorporate în structura lor cationi ai metalelor tranziționale) comparativ cu 9 antibiotice. Acești compuși au fost testați împotriva mai multor tulpini bacteriene Gram-pozitive și

cele Gram-negative. Unii POMs testați au arătat efecte antibacteriene certe, constituind o posibilă alternativă la agenții chemoterapeutici cunoscuți. Imaginea de mai jos rezumă efectele constatate.

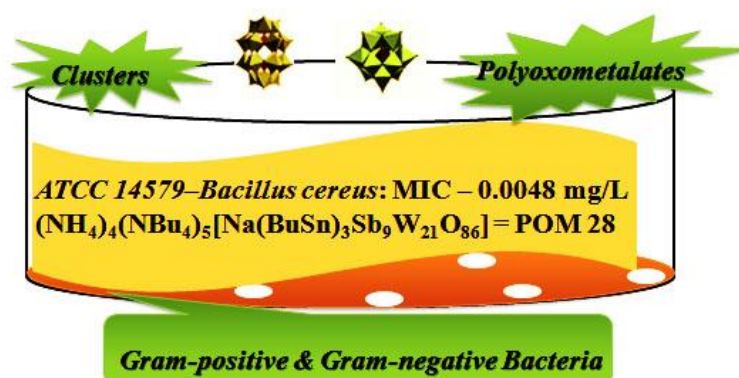


Fig. II.3.2.1. Efectele antibacteriene ale polioxometalaților (rezumat grafic).

Materiale și metode

Determinarea activității antibacteriene prin metoda difuzimetrică

Activitatea antibacteriană a 30 de polioxometalați (*setul I*) a fost determinată utilizând metoda difuzimetrică, în acord cu standardele impuse de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2009). S-au adaptat protocoale de lucru pentru acest studiu și s-au folosit cinci tulpini de referință, două Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus*) și trei specii Gram-negative (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* și *Pseudomonas aeruginosa*), cumpărate de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Citirea rezultatelor s-a realizat prin măsurarea diametrului zonei (ariei) de inhibiție. Evidențierea efectelor polioxometalaților s-a realizat prin metoda colorației Gram. POMs din *setul II* au fost testați *in vitro* împotriva a șase tulpini bacteriene de referință (două specii de bacterii Gram-pozitive – *S. aureus*, *B. cereus* – și patru specii de bacterii Gram-negative – *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. Aeruginosa*, *S. typhimurium*), precum și a unei tulpini de *Staphylococcus aureus* metilino-rezistent (*MRSA*) izolat de la un pacient cu ischemie cronică și piciorul amputat.

Determinarea activității antibacteriene prin metoda microdiluțiilor

Stabilirea concentrației minime inhibitorii (CMI)

Activitatea minimă de inhibare a bacteriilor determinată de acțiunea celor 30 de polioxometalați (*setul I*) a fost stabilită prin metoda microdiluțiilor standardizată *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2009) și pentru stabilirea CMI a celor 7 POMs din *setul II* s-a utilizat metoda

de microdiluțiilor seriate în mediu nutritiv lichid. Ambele testări s-au realizat pe aceleași tulpini bacteriene specifice fiecărui set. Citirea rezultatelor s-a realizat prin aprecierea limitei (diluției), adică godeul în care nanocompușii inhibă dezvoltarea bacteriană.

Stabilirea concentrației minime bactericide (CMB)

Activitatea minimă bactericidă s-a realizat numai pentru compușii testați în setul I, și a fost determinată prin metoda microdiluțiilor pe cele cinci specii bacteriene. Citirea s-a realizat la 24 de ore prin observarea creșterii în mediul de cultură. Au fost încadrați polioxometalații ca fiind bactericizi dacă nu au permis creșterea pe aceste medii.

Rezultate și discuții

S-au constatat efectele mai bune ale unor polioxometalați, cu o eficiență dependentă de tulpina bacteriană și de structura polioxometalatului prin măsurarea diametrelor (în mm) zonei de inhibiție a creșterii bacteriene.

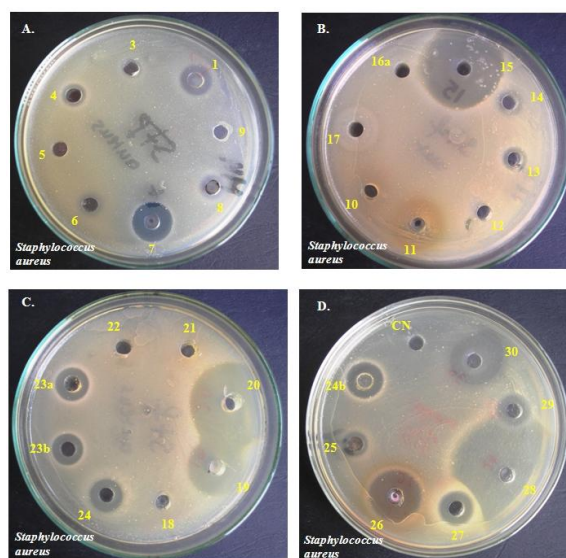


Fig. II.3.2.2. Efectul polioxometalaților (1-30) comparativ cu martorul (CN, control negativ, martor) asupra germeilor tulpinii de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P); se observă prezența zonelor de inhibiție la unii polioxometalați testați și absența lor la alții.

Singurul compus care și-a dovedit activitatea antibacteriană asupra celor 5 tulpini bacteriene testate s-a dovedit a fi compusul 28 (POM2D=POM BI-28), menținându-și acțiunea mai puternică decât a amoxicilinei, chiar dacă uneori aceasta s-a diminuat, aspecte redate în figura II.3.2.4.

Putem menționa că doar 9 compuși dintre cei 30 testați, la o concentrație de 20 μg, nu au prezentat activitate antibacteriană. Presupunem că folosirea unor concentrații mai mari de compuși apropiate de a amoxicilinei ar îmbunătăți acțiunea antibacteriană a acestora.

Concluzii

Pentru testarea activității antibacteriene (set I și set II) a polioxometalaților am ales mai multe tipuri de tulpini bacteriene de referință, având în vedere patologia determinată de acestea, atât tulpini din speciile Gram-pozitive de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* cât și tulpini din speciile Gram-negative de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*, precum și o tulpină de *Staphylococcus aureus* *meticilino-rezistent*, izolată de la un pacient cu ischemie cronică și cu piciorul amputat și care prezenta infecție cu *MRSA*.

1. S-a reușit caracterizarea polioxometalaților testați din punct de vedere al relației structură – activitate antibacteriană. Efectele antibacteriene ale acestor compuși sunt direct dependente de structura acestora și tulpina bacteriană testată, astfel sunt compuși la care dezvoltarea bacteriilor nu este inhibată (unii polioxometalați cu structură Keggin monolacunară), cu structură Keggin trilacunară și Keggin trilacunară/sandwich la care bacteriile nu au dovedit rezistență. Clusterii în general (POM BI-19, 20, 28) și polioxometalații cu structură pseudo-Keggin trilacunară/sandwich (POM BI-26) au cel mai puternic efect antibacterian pe toate tulpinile bacteriene testate, în cantitate mică (20 μg) cu o eficiență mai mare decât antibioticul testat – amoxicilina (25μg) datorită unității constitutive de tip *pseudo*-Keggin $[Sb^{III}W_9O_{33}]^{9-}$. Unii POMs au avut efect bacteriostatic, dar nu bactericid.

2. Sărurile simple de butil amoniu necomplexate au un efect mai slab antibacterian comparativ cu cele care au fragmente de butilstaniu constitutive pe toate tulpinile bacteriene testate. Putem susține că în polioxometalații (POM BI-20, 26, 27, 28) cu structurile *pseudo*-Keggin trilacunari/sandwich, unitatea constitutivă a lor de tip *pseudo*-Keggin $[Sb^{III}W_9O_{33}]^{9-}$ este responsabilă de activitatea antibacteriană foarte bună.

3. În plus, la complexare în cluster (POM BI-28) cu clorura de butil-staniu se constată o intensificare a acțiunii antibacteriene, și facem responsabil de aceasta atât fragmentele de constituție ca $[Sb^{III}W_9O_{33}]^{9-}$ (unități *pseudo*-Keggin), cât și cele trei fragmentele organometalice de butilstaniu existente în structura clusterului.

4. Dintre cei șapte POMs (set II), primii cinci au dovedit efectele antibacteriene concurențiale (în comparație cu cele nouă antibiotice), sau chiar au avut un efect mai bun decât antibioticele testate. Au avut efecte la testarea *in vitro* împotriva ambelor specii bacteriene Gram-pozitive (*S. aureus* și *B.*

cereus) și Gram-negative (*E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*), și foarte important, împotriva unor tulpini microbiene rezistente la antibiotice (*MRSA* și *P. aeruginosa*).

5. Efectele antibacteriene ale POMs (set II) au fost datorate structurii lor chimice: heteropolioxowolframați cu structuri *pseudo*-Keggin sandwich, conținând Bi^{3+} ca heteroatom, sandwich care captează trei cationi ai metalelor tranziționale. Ultimii doi POMs (set II), dar care conțin cationii Fe în lacune, au avut activitate extrem de slabă, respectiv POM 6 (cu Fe^{3+}) a fost eficace împotriva *P. aeruginosa* și *B. cereus*, în timp ce POM 7 (cu Fe^{2+}) nu prezintă activitate antibacteriană.

3.3. Activitatea antitumorală a polioxometalaților sintetizați – studii *in vitro*

Activitatea antitumorală a POMs din gama hepta- sau hexawolframaților/molibdaților s-a dovedit a fi mai puternică decât a unor citostatice (cisplatin, 5-fluorouracil, gemcitabin), testele fiind efectuate pe linii celulare tumorale izolate din tumorile unor pacienți care aveau diagnosticate diferite forme de cancer: pulmonar, gastric, pancreatic, mamar [107-109, 113, 115]. Inhibând generarea de ATP, POMs reduc activitatea mitocondriilor și în final activează apoptoza. Unele proprietăți farmacocinetice și farmacodinamice ale polioxometalaților fundamentează cercetarea privitoare la potențialul lor citostatic. În acest subcapitol prezint rezultatele (sumar redate în figura II.3.3.1) obținute în urma investigațiilor *in vitro* pe două linii celulare (HUVEC și HeLa) pentru a evalua comparativ potențialul antitumoral al heteropolioxomolibdaților cu cel al unor heteropolioxowolframați și a unui compus Anderson.

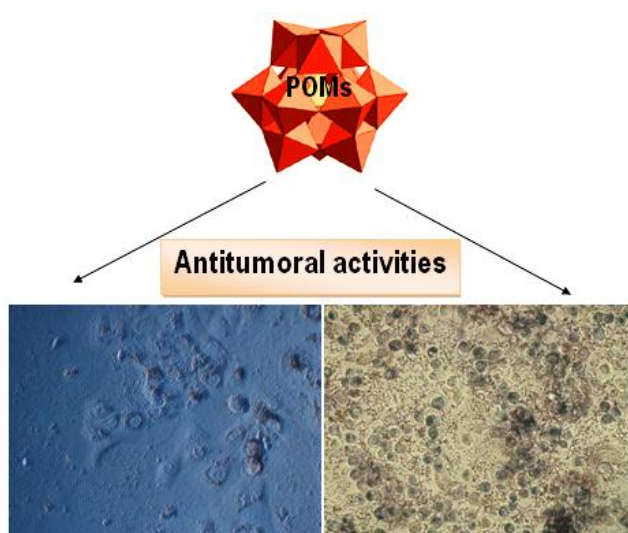


Fig. II.3.3.1. Efectelor antitumorale ale polioxometalaților (rezumat grafic).

Materiale și metode

Sistemele biologice

S-au folosit două linii celulare, o linie normală de celule endoteliale HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) și o linie tumorală de cancer de col uterin HeLa (având origine infectarea cu HPV – *Human Papilloma Virus* cu serotip 16, oncogenic).

Prepararea soluțiilor POMs

POMs au fost solubilizați în apă bidistilată, etanol sau DMSO (dimetilsulfoxid) obținându-se soluții stock, care apoi au fost diluate în mediul de cultură pornind de la concentrația maximă de 10mg/mL până la 0.0125 mg/mL pentru POM T 2, 19, 20, 21, 22 și 23 și o concentrație maximă de 1 mg/mL până la 0.00125mg/mL pentru POM T 15 și 16. Soluțiile apoase au fost apoi filtrate în vederea sterilizării cu filtre Millipore cu porozitate de 0.22 μm.

Testele MTT s-au realizat pe celulele HUVEC și HeLa aflate în faza exponențială a creșterii celulare și s-au folosit plăci cu 96 de godeuri. Un număr cunoscut de celule (2×10^4) au fost însămânțate în fiecare godeu în 200 μL mediu complet. După 16 ore de cultivare peste noapte, celulele au fost tratate cu substanțele de studiat. Fiecare determinare s-a efectuat în triplicat. După 24 ore după terapie, mediul a fost aspirat și în fiecare godeu s-au adăugat câte 100 μL de soluție de 1mg/mL de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich).

După terminarea perioadei de incubare, soluția de MTT a fost aspirată din godeuri și cristalele de formazan au fost dizolvate cu 150 μL/godeu de DMSO (dimetil sulfoxid), obținându-se o reacție de culoare. Pentru măsurarea densității optice, plăcile au fost analizate la 492 nm folosind un cititor de plăci BioTek Synergy 2. Înainte de solubilizarea cu DMSO au fost preluate și imagini în microscopia optică cu un microscop Zeiss Axiovert D1 în fază inversată, cu obiective cu mărimi de 20x, 40x, 1000x pentru a observa modificările morfologice ale celulelor expuse la tratamente. Achiziția de imagini s-a efectuat cu o cameră MRC color, folosind un soft Axiovision Rel 8.6.

Analiza statistică S-a utilizat un soft de analiză statistică GraphPad Prism 5. Datele au fost procesate folosind analiza one-way ANOVA „Dunnett’s Multiple Comparison Test”, stabilind că valoarea lui *p* să fie < 0.05 .

Rezultate și discuții

Determinarea activității antitumorale a heteropolioxomolibdaților

POM M2: S-a preparat o soluție stock de 200mg/mL în apă bidistilată. Atât celulele HUVEC cât și HeLa au prezentat o sensibilitate crescută la dozele mari până la 0.5 mg/mL, după cum reiese din figura II.3.3.2. Diferențele față de control la aceste concentrații au fost statistic diferite ($p < 0.0001$).

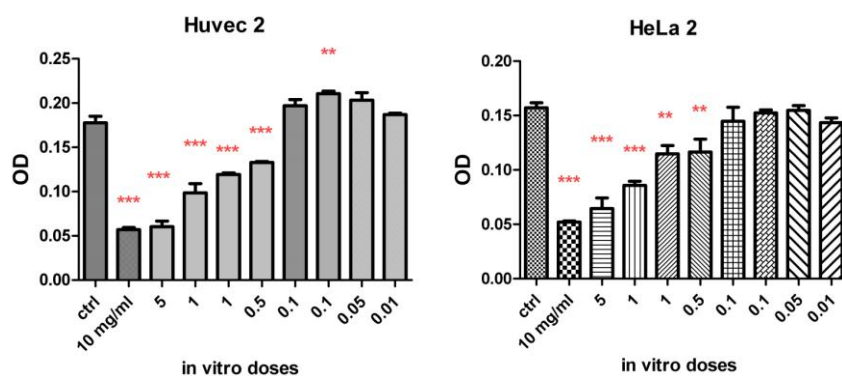


Fig. II.3.3.2. Aspectul grafic al testării MTT a celulelor HUVEC și HeLa cu POM M2.

Prin microscopie optică s-a observat scăderea numărului de celule la concentrațiile mari de 10 și 5 mg/mL, cu schimbarea morfologiei acestora, acestea devenind mai mari și mai etalate la suprafața plăcii de cultivare. Unele s-au detașat sugerând inițierea fenomenului de apoptoză celulară (figura II.3.3.3 și figura II.3.3.11).

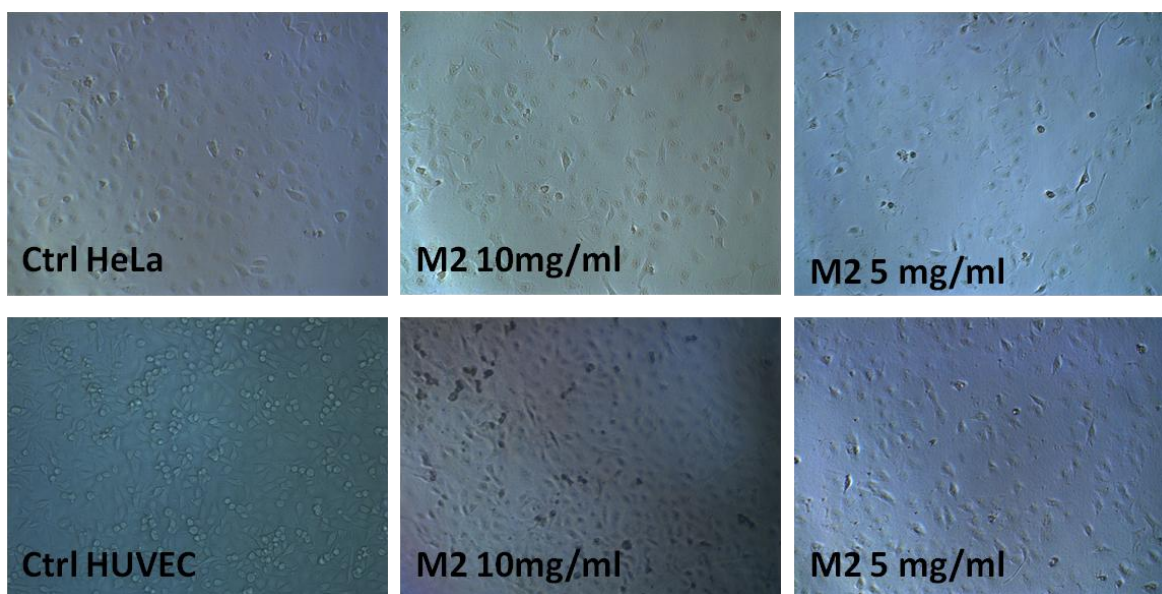


Fig. II.3.3.3. Aspectul morfologiei celulare a celulelor HUVEC și HeLa tratate cu POM M2 (10mg/mL și 5 mg/mL).

La microscopia optică s-a observat că, la dozele mari, celulele au fost acoperite de precipitatul format, dar la doza de 2.5 mg/mL s-au putut vizualiza și celulele, extrem de afectate de tratament atât ca morfologie (rotunjite, probabil în apoptoză) cât și ca număr (figura II.3.3.11).

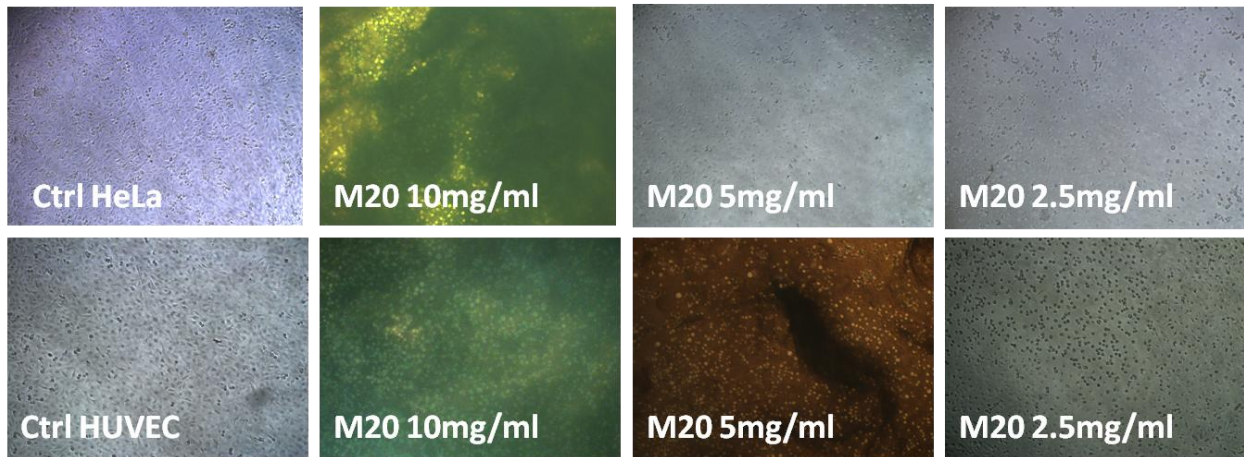


Fig. II.3.3.11. Aspectul morfologiei celulare a celulelor HUVEC și HeLa tratate cu POM M20 (10mg/mL, 5 mg/mL și 2.5 mg/mL).

Determinarea activității antitumorale a heteropolioxowolframaților

POM W3

S-a preparat o soluție de 200 mg/mL POMs în apă bidistilată. În cazul POM W3, celulele tumorale HeLa s-au dovedit a fi mai sensibile decât celulele endoteliale normale HUVEC, celulele tumorale fiind afectate chiar și la doze mici de 0.1mg/mL (figura II.3.3.22). Diferențele față de control au fost statistic semnificativ diferite ($p < 0.0001$).

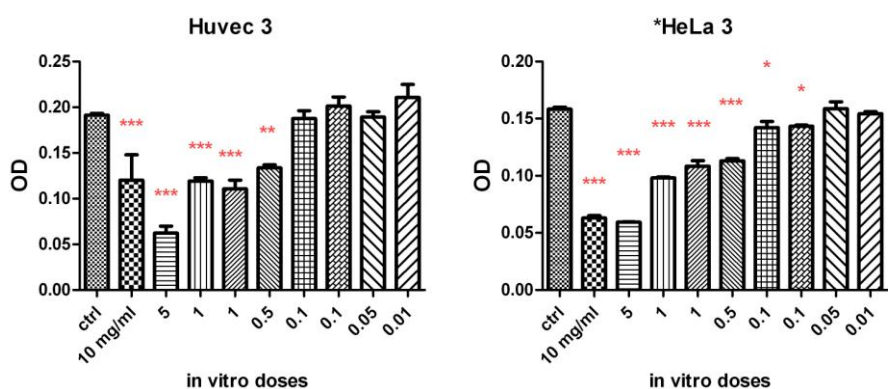


Fig. II.3.3.22. Aspectul grafic al testării MTT a celulelor HUVEC și HeLa cu POM W3.

Același aspect de celule apoptotice cu formă rotunjită dar și scăderea numărului celulelor tumorale au fost observate la concentrațiile mari (figura II.3.3.23).

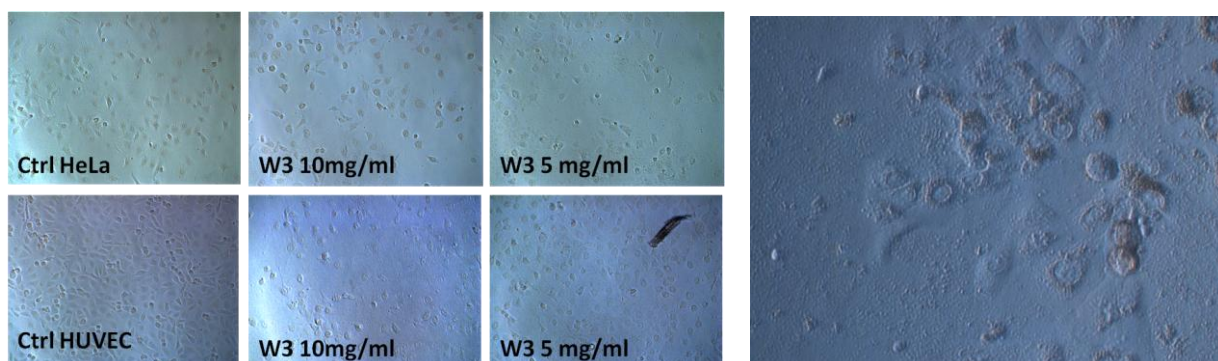


Fig. II.3.3.23. În stânga: aspectul morfologiei celulare a celulelor HUVEC și HeLa tratate cu POM W3 (10mg/mL și 5 mg/mL). În dreapta: aspectul celulelor HUVEC tratate cu POM W3 (40x, imagini preluate după 48 de ore).

Se observă internalizarea și acumularea POM W3 în apropierea spațiului perinuclear sugerând un comportament de nanocompus.

POM W25

POM W25 este solubil în apă și s-a efectuat o soluție stock de 200 mg/mL. La testul de viabilitate MTT s-a observat un efect citotoxic intens pentru ambele linii celulare. La doze mici a indus proliferarea celulelor endoteliale (celule normale, figura II.3.3.50).

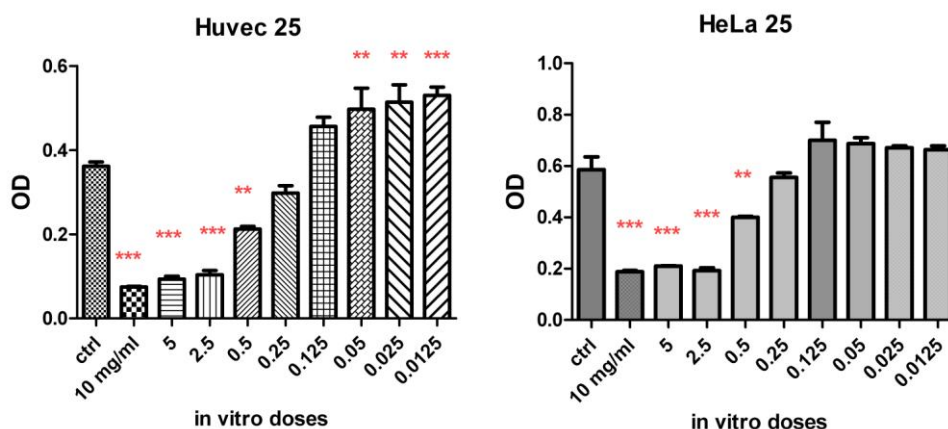


Fig. II.3.3.50. Aspectul grafic al testării MTT a celulelor HUVEC și HeLa cu POM W25.

La microscopia optică s-a demonstrat că mecanismul citotoxicității este determinat de inducerea unui fenomen de apoptoză foarte intens la dozele mari atât pentru celulele tumorale cât și pentru celulele endoteliale (figura II.3.3.51).

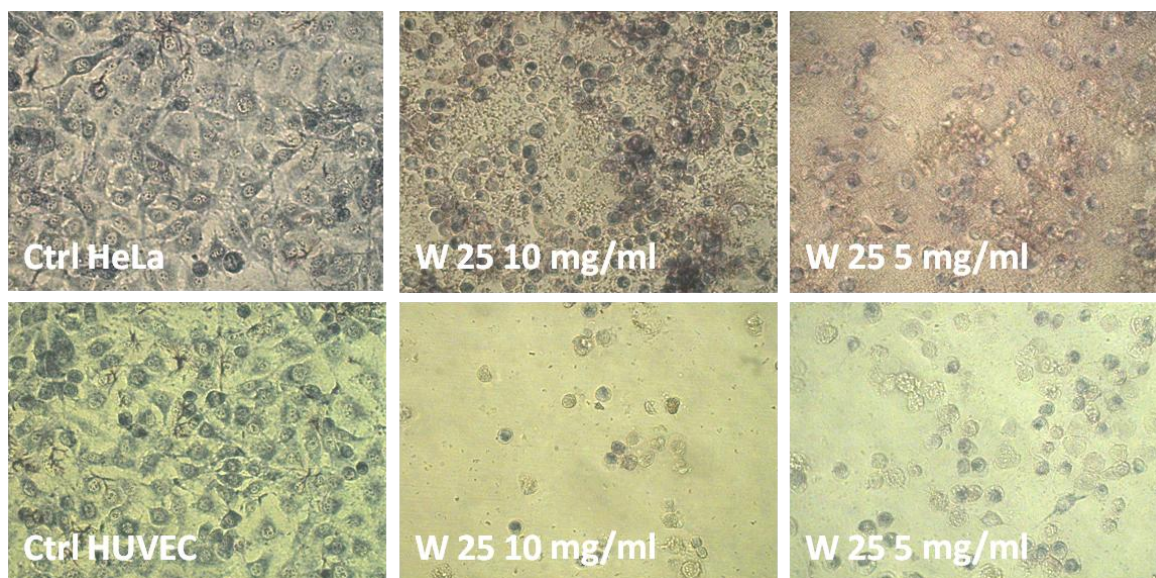


Fig. II.3.3.51. Aspectul morfologiei celulare a celulelor HUVEC și HeLa tratate cu POM W25 (10 mg/mL și 5mg/mL).

În figura II.3.3.52 se observă aspectul tipic al celulelor HeLa intrate în apoptoză după terapia cu POM W25 la doza de 10 mg/mL: membrana balonizată, condensarea cromatinei și apariția fragmentelor nucleare.

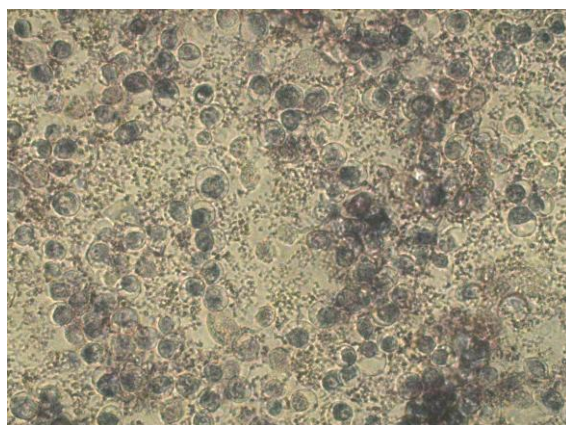


Fig. II.3.3.52. Aspectul celulelor tumorale HeLa după terapia cu POM W25 (10 mg/mL), modificări morfologice tipice fenomenului de apoptoză (mărire 400x).

Concluzii

Activitatea antitumorală a heteropolioxowolframților.

Efectul asupra celor două linii celulare a POMs cu W a fost diferit în ceea ce privește viabilitatea celulară și influența asupra creșterii/proliferării celulare. Astfel, unii POMs s-au dovedit a fi complet netoxici, neafectând proliferarea celulară, alți POMs au indus fenomenul de apoptoză, mai ales la tratamentul cu doze mai mari. Cel mai eficient a fost POM W25 care a indus moartea celulelor atât tumorale cât și endoteliale și la doze mici de 0.25 mg/mL. La doze mici, unii compuși au determinat chiar o creștere a proliferării celulare (a celulelor tumorale HeLa): POM W10 și W14. S-a observat o oarecare selectivitate, cu efecte mai pronunțate în funcție de tipul celular. Aceste constatări nu sunt nefavorabile dacă ne gândim la terapia cancerului, deoarece și celulele endoteliale sunt ținta tratamentelor antitumorale, urmărindu-se inhibiția fenomenului de neoangiogeneză tumorală (factor agravant al evoluției și metastazării tumorale).

POM W3 a avut o particularitate observată în microscopia optică la mărire mare. Celulele tratate 48 ore cu o doză mare au acumulat și concentrat în apropierea spațiului perinuclear compusul POM W3, sugerând un comportament al acestuia similar cu cel al structurilor de tip nano. Acest aspect se constituie într-o dovadă a dimensiunii acestor nanocompuși.

Activitatea antitumorală a heteropolioxomolibdaților.

Toți POMs cu molibden au avut efect citotoxic asupra celor două linii celulare, efect exercitat mai ales prin inițierea fenomenului de apoptoză. Acest efect s-a observat atât la doze mari cât și la doze mici (POM M2, 15, 16). Selectivitatea în funcție de linia celulară a fost evidentă. Astfel, POM M2, 15, 16, 20 au indus un răspuns apoptotic mai intens a celulelor de tip endotelial HUVEC, iar POM M21, 22, 23 au acționat mai puternic asupra celulelor tumorale HeLa, cu posibila indicație de selectivitate terapeutică: antitumorală directă sau anti-angiogenică.

Un dezavantaj important l-a reprezentat solubilizarea dificilă a unor POM chiar în solvenți organici (POM M19, 20, 21, 22, 23) și reprecipitarea lor în mediul de cultură (POM M20, 21, 22, 23). Chiar și în aceste condiții, acești POM și-au exercitat efectul citotoxic uneori chiar și la doze mici.

CONCLUZII GENERALE

1. S-au caracterizat din punct de vedere fizico-chimic și al activității biologice 50 de compuși, din care 40 sintetizați prin diferite metode adaptate după cele descrise în literatura de specialitate și 7 sunt compuși noi: $(\text{NH}_4)_4[\text{NBu}_4]_5[\text{Na}(\text{BuSn})_3\text{Sb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}] \cdot 17\text{H}_2\text{O}$ (POM 2 D=POM BI-28); $\text{Na}_8[\text{La}_2(\text{H}_2\text{O})_6(\text{Bi}_2\text{W}_{20}\text{O}_{70})] \cdot 37\text{H}_2\text{O}$ (POM T-8); $\text{Na}_{15}[(\text{CeO})_3(\text{OH}_2)_2(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 45\text{H}_2\text{O}$ (POM T-10); $\text{K}_6[\text{SiVW}_{11}\text{O}_{40}] \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (POM BI-30); $\text{K}_6[\text{Si}(\text{VO})\text{Mo}_2\text{W}_9\text{O}_{39}] \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ (POM BI-7); $\text{Na}_5[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})\text{GeW}_{11}\text{O}_{39}] \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ (POM BI-24a,b=POM T-26); $\text{Na}_{14}[\text{Mn}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{SiW}_9\text{O}_{34})_2] \cdot 25\text{H}_2\text{O}$ (POM BI-27=POM T-11).

2. Doi polioxometalați dintre care unul nou, cu diametrul mediu de 2-4 nm, au arătat o activitate semnificativă hipoglicemiantă, consecutivă tratamentului oral pe un model animal de diabet STZ-indus. Anionul tris-(vanadil)-tungsto-antimoniatul(III) (POM 1D=POM T-7=POM BI-10) testat s-a dovedit a fi mai puternic în toate privințele decât anionul tris-butilstaniu-21-tungsto-9-antimoniatul(III) (POM 2D=POM BI-28). În plus, unul dintre principalele avantaje emergente din acest studiu cu acești nanocompuși a fost reprezentat de toxicitatea lor scăzută, în funcție de doză. Pe baza studiilor *in vivo* și *in vitro*, am ajuns la concluzia că cei doi polioxometalați testați și-au exercitat efectele lor hipoglicemiant prin două mecanisme diferite și concomitente: au prevenit apoptoza celulelor β -pancreatice (și ulterioara reducere a cantității de insulină) și au stimulat diferențierea celulelor stem rezidente în noi celule pancreatice producătoare și secretoare de insulină.

3. S-a reușit caracterizarea polioxometalaților testați din punct de vedere al relației structură – activitate antibacteriană. Efectele antibacteriene ale acestor compuși sunt direct dependente de structura acestora și tulpina bacteriană testată, astfel sunt compuși la care dezvoltarea bacteriilor nu

este inhibată (unii polioxometalați cu structură Keggin monolacunară), cu structură Keggin trilacunară și Keggin trilacunară/sandwich la care bacteriile nu au dovedit rezistență. Unii POMs au avut efect bacteriostatic, dar nu bactericid. Sărurile simple de butil amoniu necomplexate au un efect mai slab antibacterian comparativ cu cele care au fragmente de butilstaniu constituențe pe toate tulpinile bacteriene testate. Putem susține că în polioxometalații (POM BI-20, 26, 27, 28) cu structurile *pseudo*-Keggin trilacunari/sandwich, unitatea constitutivă a lor de tip *pseudo*-Keggin $[\text{Sb}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33}]^{9-}$ este responsabilă de activitatea antibacteriană foarte bună. Dintre cei șapte POMs (set II), primii cinci au dovedit efectele antibacteriene concurențiale (în comparație cu cele nouă antibiotice), sau chiar au avut un efect mai bun decât antibioticele testate. Au avut efecte la testarea *in vitro* împotriva ambelor specii bacteriene Gram-pozitive (*S. aureus* și *B. cereus*) și Gram-negative (*E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*), și foarte important, împotriva unor tulpini microbiene rezistente la antibiotice (*MRSA* și *P. aeruginosa*). Efectele antibacteriene ale POMs (set II) au fost datorate structurii lor chimice: heteropolioxowolframați cu structuri *pseudo*-Keggin sandwich, conținând Bi^{3+} ca heteroatom, sandwich care captează trei cationi ai metalelor tranziționale. Ultimii doi POMs (set II), dar care conțin cationi Fe, au avut activitate extrem de slabă, respectiv POM 6 (cu Fe^{3+}) a fost eficace împotriva *P. aeruginosa* și *B. cereus*, în timp ce POM 7 (cu Fe^{2+}) nu prezintă activitate antibacteriană.

4. Din perspectiva acțiunii antitumorale s-a reușit caracterizarea a 25 de POMs din cei 27 testați.

Efectul heteropolioxowolframaților asupra celor două linii celulare (HUVEC și celule tumorale HeLa) a fost diferit în ceea ce privește viabilitatea celulară și influența asupra creșterii/proliferării celulare. Astfel, unii POMs s-au dovedit a fi complet netoxici, neafectând proliferarea celulară, alți POMs au indus fenomenul de apoptoză, mai ales la tratamentul cu doze mai mari. Cel mai eficient a fost POM W25 care a indus moartea celulelor atât tumorale cât și endoteliale și la doze mici de 0.25 mg/mL. S-a observat o oarecare selectivitate, cu efecte mai pronunțate în funcție de tipul celular.

Toți heteropolioxomolibdații au avut efect citotoxic asupra celor două linii celulare, efect exercitat mai ales prin inițierea fenomenului de apoptoză. Acest efect s-a observat atât la doze mari cât și la doze mici (POM M2, 15, 16). Selectivitatea în funcție de linia celulară a fost evidentă. Astfel, POM M2, 15, 16, 20 au indus un răspuns apoptotic mai intens a celulelor de tip endotelial HUVEC, iar POM M21, 22, 23 au acționat mai puternic asupra celulelor tumorale HeLa, cu posibila indicație de selectivitate terapeutică: antitumorală directă sau anti-angiogenică.

Bibliografie selectivă

1. Berzelius, J.J.; *Poggend. Ann. Phys. Chem.*, **1826**, 6, 369.
2. Gouzerh, P.; Che, M.; *L'Actualité Chimique*, **2006**, 298, 1.
3. Keggin, J.F.; *Nature*, **1933**, 131, 908.
4. Keggin, J.F.; *Nature*, **1933**, 132, 351.
5. Keggin, J.F.; *Proc. Roy. Soc. A*, **1934**, 144, 75.
6. Pope, M.T.; *Heteropoly and Isopoly Oxometalates*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1983**.
7. Pope, M.T.; Müller, A.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1991**, 30, 34.
8. Marcu, Gh.; Rusu, M.; *Chimia polioxometalaților*, Ed. Tehnică, București, **1997**.
9. Yamase, T.; *Polyoxometalates: from Platonic Solids to Anti-Retroviral Activity*, Pope, M.T.; Müller, A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1994**.
10. Lindqvist, I.; *Arkiv Kemi*, **1950**, 2, 325.
11. Lindqvist, I.; *Arkiv. Kemi*, **1950**, 2, 349.
12. Anderson, J.S.; *Nature*, **1937**, 140, 850.
13. Evans Jr., H.T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 1291.
14. Wells, A.F.; *Structural Inorganic Chemistry*, 1st Ed, Clarendon Press, Oxford, **1945**, 344.
15. Dawson, B.; *Acta Cryst.*, **1953**, 6, 113.
16. Clayette, P.; Dormont, D.; *Polyoxometalates: from Platonic Solids to Anti-Retroviral Activity*, Pope, M.T.; Müller, A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1994**, 387.
17. *Polyoxometalate Chemistry from Topology via Self-Assembly to Applications*, Pope, M.T.; Müller, A. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **2001**.
18. *Polyoxometalate Chemistry for Nano-Composite Design*, Yamase, T.; Pope, M.T. (ed), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2002**.
19. *Polyoxometalate Molecular Science*, Borrás-Almenar, J.J.; Coronado, E.; Müller, A.; Pope, M.T. (eds), *NATO Science Series II*, Vol. 98, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **2003**.
20. Fan, D.; Hao, J. Polyoxometalate-Based Assembly. In *Self-Assembled Structures. Properties and Applications in Solution and on Surfaces*. Hao, J. (ed), CRC Press Taylor&Francis Group, Boca Raton, 2011, 141–174.
21. Müller, A.; Peters, F.; Polyoxometalates: Very Large Clusters – Nanoscale Magnets. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 239.
22. Long, D.L.; Burkholder, E.; Cronin, L. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 105.
23. Long, D.L.; Tsunashima, R.; Cronin, L.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1736.

24. Müller, A.; Peters, F.; Pope, M.T.; Gateschi, D.; *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 239.
25. Müller, A.; Kogerler, P.; Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Chemistry, **1998**, 46, 207.
26. Müller, A.; Fenske, D.; Kogerler, P.; *Curr. Op. Solid State Mat. Sci.*, **1999**, 4, 141.
27. Choi, H.; Kwon, Y.; Han, O.; *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 1641.
28. Caruso, F.; Kurth, G.D.; Dirk, G.; Volkmer, D.; Koop, M.J.; Muller, A.; *Langmuir*, **1998**, 14, 3462.
29. Polarz, S.; Smarsly, B.; Goltner, C.; Antonietti, M.; *Adv. Maters*, **2000**, 12, 1503.
30. Muller, A.; Kogerler, P.; Bogge, H.; *Structure and Bonding*, **2000**, 96, 203.
31. Ribot, F.; Sanchez, C.; *Inorg. Chem.*, **1999**, 20, 327.
32. Kurth, G. D.; Lehmann, P.; Volkmer, D.; Muller, A.; Schwahn, D.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 21, 3989.
33. Yang, W.; Xiang, L.; Lu, X.; Hong, C.; Zhuang, H.; Huang, J.; *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 2706.
34. Cronin, L.; Beugholt, C.; Muller, A.; *Theochem.*, **2000**, 500, 181.
35. Tang, Z.; Shaoqin, L.; Wang, E.; Dong, S.; *Langmuir*, **2000**, 16, 4946.
36. Wang, X.; Liu, L.; Zhang, G.; Jacobson, A.; *Chem. Commun.*, **2001**, 23, 2472.
37. Kurth, D.G.; Lehmann, P.; Volkmer, D.; Colfen, H.; Koop, M.J.; Muller, A.; Du Chesne, A.; *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 385.
38. Sanchez, C.; De Soler-Illia, G.J.; Ribot, F.; Lalot, T.; Mayer, C.R.; Cabuil, V.; *Chem. Mat.*, **2001**, 13, 3061.
39. Xu, L.; Mingqiang, L.; Wang, E.; *Mat. Lett.*, **2002**, 54, 303.
40. Polarz, S.; Smarsly, B.; Antonietti, M.; *Chem. Phys. Chem*, **2001**, 2, 457.
41. Wang, Y.; Wang, X.; Changwen, H.; *J. Coll. Interf. Sci.*, **2002**, 249, 307.
42. Liu, S.; Kurth, D.; Volkmer, D.; *Chem. Commun.*, **2002**, 9, 976.
43. Mayer, C.R.; Neveu, S.; Cabuil, V.; *Angew. Chem.*, **2002**, 41, 501.
44. Yamase, T.; Prokop, P.; *Angew. Chem.*, **2002**, 41, 466.
45. Rusu, D.; Bâlici, S.; *Polioxometalații. Aplicații biomedicale*, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, România, **2013**.
46. Zou, N.; Chen, W.L.; Li, Y.G.; Liu, W.L.; Wang, E.B.; *Inorg. Chem. Commun.*, **2008**, 11, 1367.
47. Wu, H.; *J. Biol. Chem.*, **1920**, 43, 189.
48. Tézé, A.; Hervé, G.; *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1977**, 39, 999.
49. Rusu, D.; Crăciun, C.; *Cercetări fizico-chimice în domeniul polioxometalaților complecși*, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, **2006**.

50. Klemperer, W.G.; Shum, W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 4891.
51. Jahr, K.F.; Fuchs, J.; *Chem. Ber.*, **1963**, *96*, 2457.
52. Rusu, M.; Marcu, Gh.; Rusu, D.; Roșu, C.; Tomșa, A.R.; *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1999**, *242*, 467.
53. Santoni, M.P.; Pal, A.K.; Hanan, G.S.; Tang, M.C.; Furtosa, A.; Hasenknopf, B.; *Dalton Trans.*, **2014**, *43*, 6990.
54. Pătruț, A.; Bögge, H.; Forizs, E.; Rusu, D.; Lowy, D.A.; Mărgineanu, D.; Naumescu, A.; *Rev. Roum. Chim.*, **2010**, *55*, 865.
55. Khoshnavazi, R.; Nicolò, F.; Rudbari, H.A.; Naseri, E.; Aminipour, A.; *J. Coord. Chem.*, **2013**, *66*, 1374.
56. Semenovskaya, E.N.; *Zh. Anal. Khim.*, **1986**, *41*, 1925.
57. Parker, G.A.; *Analytical Chemistry of Molybdenum*, Springer-Verlag, New-York, **1983**.
58. Semenovskaya, E.N.; *J. Anal. Chem. USSR (Engl. Transl.)*, **1986**, *41*, 1339.
59. Hill, C.L.; Prosser-McCartha, C.M.; *Coord. Chem. Rev.*, **1995**, *143*, 407.
60. Zhai, F.; Li, D.; Zhang, C.; Wang, X.; Li, R.; *Europ. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 1911.
61. Yamase, T.; Fujita, H.; Fukushima, K.; *Inorg. Chim. Acta*, **1988**, *151*, 15.
62. Yamase, T.; *Polymeric Materials Encyclopedia: Synthesis, Properties and Applications*, J.C. Salamone Eds., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, **1996**, 365.
63. Cindric, M.; Veksli, Z.; Kamenar, B.; *Croat. Chem. Acta*, **2009**, *82*, 345.
64. Rhule, J.T.; Hill, C.L.; Judd, D.A.; Schinazi, R.F.; *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 327.
65. Hasenknopf, B.; *Front. Biosci.*, **2005**, *10*, 275.
66. Cibert, C.; Jasmin, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1982**, *108*, 1424.
67. Berry, J.P.; Galle, P.; *Exp. Mol. Path.*, **1990**, *53*, 255.
68. Cholewa, M.; Legge, G.J.F.; Weigold, H.; Holan, G.; Birch, C.; *J. Life Sci.*, **1994**, *54*, 1607.
69. Ni, L.; Greenspan, P.; Gutman, R.; Kelloes, C.; Farmer, M.A.; Boudinot, F.D.; *Antiviral Res.*, **1995**, *32*, 141.
70. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D., Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; *Molecular Biology of The Cell*, Garland Science Publishing, Inc., Taylor&Francis Group, New York, **2015**.
71. Benga, Gh.; *Introducere în Biologia Celulară și Moleculară*, Ed. Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, **2005**.
72. Yamase T.; *J. Mater. Chem.*, **2005**, *15*, 4773.
73. Tajima, Y.; Nagasawa, Z.; Tadano, J.; *Microb. Immun.*, **1993**, *37*, 695.

74. Tajima Y.; *Biomed. Res.*, **2002**, *23*, 115.
75. Tajima, Y.; Nagasawa, Z.; Tanabe, I.; Kusaba, K.; Tadano, J.; *Microb. Immun.*, **1994**, *38*, 639.
76. Fukuda, N.; Yamase, T.; Tajima, Y.; *Biol. Pharm. Bull.*, **1999**, *22*, 463.
77. Yamase, T.; Fukuda, N.; Tajima, Y.; *Biol. Pharm. Bull.*, **1996**, *19*, 459.
78. Inoue, M.; Suzuki, T.; Fujita, Y.; Oda, M.; Matsumoto, N.; Iijima, J.; Yamase, T.; *Biomed. Pharmacother.*, **2006**, *60*, 220.
79. Tajima, Y.; *Biol. Pharm. Bull.*, **2001**, *24*, 1079.
80. Inoue, M.; Segawa, K.; Matsunaga, S.; Matsumoto, N.; Oda, M.; Yamase, T.; *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 1023.
81. Bae, E.; Lee, J.W.; Hwang, B.H.; Yeo, J.; Yoon, J.; Cha, H.J.; Choi, W.; *Chemosphere*, **2008**, *72*, 174.
82. Kong, Y.; Pan, L.; Peng, J.; Xue, B.; Lu, J.; Dong, B.; *Mat. Lett.*, **2007**, *61*, 2393.
83. Colby, D.W.; Prusiner, S.B.; *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.*, **2011**, *3*, 1.
84. Wille, H.; Shanmugam, M.; Murugesu, M.; Ollesch, J.; Stubbs, G.; Long, J.R.; Safar, J.G.; Prusiner, S.B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 3740.
85. Raynaud, M.; Chermann, J.C.; Plata, F.; Jasmin, C.; Mathe, G.; *C.R. Acad. Sci., Ser.D*, **1971**, *272*, 347.
86. Bonissol, C.; Kona, P.; Chermann, J.C.; Jasmin, C.; Raynaud, M.; *C.R. Acad. Sci., Ser.D*, **1972**, *274*, 3030.
87. Tsiang, H.; Atanasiu, P.; Chermann, J.C.; Jasmin, C.; *J. Gen. Virol.*, **1978**, *40*, 665.
88. Bussereau, F.; Ermine, A.; *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, **1983**, *134E*, 487.
89. Souyri-Corporale, M.; Tovey, M.G.; Ono, K.; Jasmin, C.; Chermann, J.C.; *J. Gen. Virol.*, **1984**, *65*, 831.
90. Chermann, J.C.; Sinoussi, F.; Jasmin, C.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, *65*, 1229.
91. Bussereau, F.; Chermann, J.C.; DeClercq, E.; Hannoun, C.; *Ann. Virol.*, **1983**, *134E*, 127.
92. Rozenbaum, W.; Dormont, D.; Spoirre, B.; Vilmer, E.; Gentilini, M.; Griscelli, C.; Montagnier, L.; Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J.C.; *Lancet*, **1985**, *1*, 450.
93. Moskovitz, B.L.; *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1988**, *32*, 1300.
94. Take, Z.; Tokutake, Y.; Inoue, Y.; Yoshida, T.; Yamamoto, A.; Yamase, T.; Nakamura, S.; *Antiviral Res.*, **1991**, *15*, 113.
95. Inouye, Y.; Tokutake, Y.; Yoshida, T.; Seto, Y.; Hujita, H.; Dan, K.; Yamamoto, A.; Nishiya, S.; Yamase, T.; Nakamura, S.; *Antiviral Res.*, **1993**, *20*, 317.

96. Weeks, M.S.; Hill, C.L.; Shinazi, R.F.; *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 1216.
97. Blasecki, J.W.; *Polyoxometalates: from Platonic Solids to Anti-retroviral Activity*, Kluwer Acad.Pub., Dordrecht, **1994**, 373.
98. Flutsch, A.; Schroeder, T.; Grutter, M.G.; Patzke, G.R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 1162.
99. Sarafianos, S.G.; Kortz, U.; Pope, M.T.; Modak, M.J.; *Biochem. J.*, **1996**, *319*, 619.
100. Wang, J.; Qu, X.; Qi, Y.; Li, J.; Song, X.; Li, L.; Yin, D.; Xu, K.; Li, J.; *PLoS ONE*, **2014**, *9(6)*:e98292.
101. De Clercq, E.; *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, *1587*, 258.
102. Liu, J., Mei, W.J., Xu, A.W., Tan, C.P., Shi, S., Ji, L.N., *Antiviral Res.*, **2004**, *62*, 65.
103. Liu, Y.N.; Shi, S.; Mei, W.J.; Tan, C.P.; Chen, L.M.; Liu, J.; Zheng, W.J.; Ji, L.N.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 1963.
104. Qi, Y.F.; Zhang, H.; Wang, J.; Jiang, Y.; Li, J.; Yuan, Y.; Zhang, S.; Xu, K.; Li, Y.; Li, J.; Niu, J.; Wang, E.; *Antiviral Res.*, **2012**, *93*, 118.
105. Zhang, H., Qi, Y.F.; Ding, Y.; Wang, J.; Li, Q.; Zhang, J.; Jiang, Y.; Chi, X.; Li, J.; Niu, J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 1664.
106. Mukherjee, H.N.; *J. Indian Med. Assoc.*, **1965**, *44*, 477.
107. Yanagie, H.; Ogata, A.; Mitsui, S.; Hisa, T.; Yamase, T.; Eriguchi, M.; *Biomed. Pharmacother.*, **2006**, *60*, 349.
108. Ogata, A.; Mitsui, S.; Yanagie, H.; Kasano, H.; Hisa, T.; Yamase, T.; Eriguchi, M.; *Biomed. Pharmacother.*, **2005**, *59*, 240.
109. Ogata, A.; Yanagie, H.; Ishikawa, E.; Mitsui, S.; Yamashita, A.; Hasumi, K.; Takamoto, S.; Yamase, T.; Eriguchi, M.; *Br. J. Cancer*, **2008**, *98*, 2, 399.
110. ***; *Oxford Handbook of Oncology – Principles of chemotherapy*, Oxford University Press Inc., New York, **2006**.
111. Cruce, M.; Stănoiu, B.; Cruce, R.; Ardelean, A.; Pirici, D.; Pisoschi, C.; *Căi și Rețele de Semnalizare celulară*, Ed. AIUS, Craiova, **2004**.
112. Moldoveanu, E.; Popescu, L.M.; *Apoptoza – Mecanisme moleculare*, Ed. Universitară „Carol Davila”, București, **1999**.
113. Prudent, R.; Moucadel, V.; Laudet, B.; Barette, C.; Lafanechere, L.; Hasenknopf, B.; Li, J.; Bareyt, S.; Lacote, E.; Thorimbert, S.; Malacria, M.; Gouzerh, P.; Cochet, C.; *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 683.

114. Niefind, K.; Issinger, O.G.; *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1804*, 484.
115. Prudent, R.; Sautel, C.F.; Cochet, C.; *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1804*, 493.
116. Sha, J.Q., Li, X., Zhou, Y.H., Yan, P.F., Li, G.M., Wang, C., *Solid State Sci.*, **2011**, *13*, 1972.
117. Tan, R., Pang, X., Wang, H., Cui, S., Jiang, Y., Wang, C., Wang, X., Song, W., *Inorg. Chem. Commun.*, **2012**, *25*, 70.
118. Menon, D., Thomas, R.T., Narayanan, S., Maya, S., Jayakumar, R., Hussain, F., Lakshmanan, V.K., Nair, S.V., *Carbohydrate Polymers*, **2011**, *84*, 887.
119. Feng, C., Gan, Q., Liu, X., He, H., *J. Rare Earths*, **2012**, *30*, 467.
120. Liu, X., Gan, Q., Feng, C., *J. Rare Earths*, **2012**, *30*, 604.
121. Yamase, T.; *Mol. Eng.*, **1993**, *3*, 241.
122. Ruzzene, M.; Pinna, L.A.; *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1804*, 499.
123. Zhang, H.M.; Wang, Y.Q.; Zhou, Q.H.; Wang, G.L.; *J. Molec. Struc.*, **2009**, *921*, 156.
124. Mioc, U.B.; Todorovic, M.R.; Davidovic, M.; Colombari, Ph.; Holclajtner-Antunovic, I.; *Solid State Ionics*, **2005**, *176*, 3005.
125. Mioc, U.B.; Kuntic, V.S.; Nedic, Z.P.; Filipovic, I.M.; Jelic, S.B.; *J. Serb. Chem. Soc.*, **1996**, *61*, 767.
126. World Health Organization, Diabetes Programme. <http://www.who.int/diabetes/en>.
127. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **2003**, *26*, 3160.
128. Richardson, S.J.; Morgan, N.G.; Foulis, A.K.; *Endocr. Pathol.*, **2014**, *25*, 80.
129. Yoon, J. W.; Hee-Sook Jun, H. S.; *Am. J. Therapeut.*, **2005**, *12*, 580.
130. Roglic, G.; Unwin, N.; Bennett, P. H.; Mathers, C.; Tuomilehto, J.; Nag, S.; Connolly, V.; King, H.; *Diabetes Care*, **2005**, *28*, 2130.
131. Ledford, H.; *Nature*, **2013**, *504*, 198.
132. Lenzen, S.; *Diabetologia*, **2008**, *51*, 216.
133. Wankeu-Nya, M.; Florea, A.; Bâlici, S.; Watcho, P.; Matei, H.; Kamanyi, A.; *BMC Complement. Altern. Med.*, **2013**, *13*:71.
134. Vardatsikos, G.; Pandey, N.R.; Srivastava, A.K., *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, *120*, 8.
135. Kawabe, K.; Sasagawa, T.; Yoshikawa, Y.; Ichimura, A.; Kumekawa, K.; Yanagihara, N.; Takino, T.; Sakurai, H.; Kojima, Y.; *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2003**, *8*, 893.
136. Willsky, G.R.; Chi, L.H.; Godzala III, M.; Kostyniak, P.J.; Smee, J.J.; Trujillo, A.M.; Alfano, J.A.; Ding, W.; Hu, Z.; Crans, D.C.; *Coord. Chem. Rev.*, **2011**, *255*, 2258.

137. Crans, D.C.; Smee, J.J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L.; *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 849.
138. Goc, A.; *Cent. Eur. J. Biol. (CEJB)*, **2006**, *1*, 314.
139. Munoz, M.C.; Barbera, A.; Dominguez, J.; Fernandez-Alvarez, J.; Gomis, R.; Guinovart, J.J.; *Diabetes*, **2001**, *50*, 131.
140. Fernandez-Alvarez, J.; Barbera, A.; Nadal, B.; Barcelo-Batlloiri, S.; Piquer, S.; Claret, M.; Guinovart, J.J.; Gomis, R. *Diabetologia*, **2004**, *47*, 470.
141. Altirriba, J.; Barbera, A.; Del Zotto, H.; Nadal, B.; Piquer, S.; Sanchez-Pla, A.; Gagliardino, J.J.; Gomis, R.; *BMC Genomics*, **2009**, *10*:406.
142. Lyonnet, B.; Martz, M.; Martin, E.; *La Presse Médicale*, **1899**, *32*, 191.
143. Srivastava, A.K.; *Mol. Cell. Biochem.*, **2000**, *206*, 177.
144. Domingo, J.L.; *Biol. Trace Elem. Res.*, **2002**, *88*, 97.
145. Badmaev, V.; Prakash, S.; Majeed, M.; *J. Altern. Complement. Med.*, **1999**, *5*, 273.
146. Thompson, K. H.; Orvig, C.; *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 1925.
147. Goldfine, A.B.; Patti, M.E.; Zuberi, L.; Goldstein, B.J.; LeBlanc, R.; Landaker, E.J.; Jiang, Z.Y.; Willsky, G.R.; Kahn, C.R.; *Metabolism*, **2000**, *49*, 400.
148. Soveid, M.; Dehghani, G.A.; Omrani, G.R.; *Arch. Iran Med.*, **2013**, *16*, 408.
149. Shechter, Y.; Karlish, S.J.D.; *Nature*, **1980**, *284*, 556.
150. Meyerovitch, J.; Farfel, Z.; Sack, J.; Shechter, Y.; *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 6658.
151. Heyliger, C.E.; Tahiliani, A.G.; McNeill, J.H.; *Science*, **1985**, *227*, 1474.
152. Cam, M.C.; Brownsey, R.W.; McNeill, J.H.; *Can. J. Physiol. Pharm.*, **2000**, *78*, 829.
153. Nomiya, K.; Torii, H.; Hasegawa, T.; Nemoto, Y.; Nomura, K.; Hashino, K.; Uchida, M.; Kato, Y.; Shimizu, K.; Oda, M.; *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, *86*, 657.