

Испитивање предности примене полиоксометалата Wells-Dawson-овог типа у трансмисионој електронској микроскопији

Увод

Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ) представља једну од најзначајнијих метода визуелизације у биомедицинским истраживањима, зато што омогућава детаљан увид у ултраструктуру ћелија и ткива на нанометарском нивоу (1). Захваљујући својој високој резолуцији, ТЕМ има кључну улогу у проучавању ћелијске организације, морфологије органела, као и у разумевању патолошких промена које прате различита обољења (1).

Квалитет добијених фотомикрографија у великој мери зависи од примене одговарајућих и поузданих контрастних средстава. (1). За контрастирање узорака у трансмисионој електронској микроскопији у досадашњој пракси најчешће се користе соли тешких метала, од којих уранил-ацетат и олово-цитрат деценијама уназад заузимају водећу позицију јер омогућавају добро наглашавање мембрана, нуклеарних структура и цитоплазматских органела (2). Међутим, уранил-ацетат је последњих година окарактерисан као радиоактивно и високо токсично једињење, што представља ризик за лабораторијско особље и захтева строге мере безбедности, посебне услове коришћења, али и складиштења и одлагања овог једињења (3). У великом броју земаља је забрањена употреба уранил-ацетата, што представља велики проблем у модерној трансмисионој електронској микроскопији (3). С обзиром на наведена ограничења, последњих година постоји изражена потреба за развојем нових, безбеднијих и ефикаснијих контрастних агенаса који би могли да замене класична уранијумска једињења (2,3). Истовремено, савремена биомедицинска истраживања захтевају све прецизнију визуелизацију субцелуларних структура, што додатно наглашава значај проналажења нових материјала погодних за трансмисиону електронску микроскопију.

У том контексту, посебну пажњу привлаче полиоксометалати (ПОМ-ови) - велика група неорганских једињења изграђених од оксо-кластера прелазних метала, најчешће волфрама, молибдена и ванадијума (4). Полиоксометалати се одликују изузетном структурном разноврсношћу, високом електронском густином, стабилношћу и способношћу редокс реакција, што их чини интересантним за примену у различитим областима, укључујући медицину и биологију (4-8). Бројна истраживања су показала да

полиоксометалати поседују биолошку активност, укључујући антивирусна, антибактеријска и антитуморска својства, као и способност интеракције са протеинима, липидима и нуклеинским киселинама (7,8). Управо ове особине указују на њихов потенцијал за примену у хистолошким и микроскопским техникама. Поред тога, у поређењу са класичним контрастним средствима, поједини полиоксометалати показују знатно мању токсичност и већу хемијску стабилност, што их чини погодним кандидатима за биолошке примене (9,10).

Посебно значајну групу представљају полиоксометалати Wells–Dawson-овог типа, који се одликују стабилном структуром и могућношћу различитих модификација (11). Лакуарни облици ових једињења омогућавају уградњу различитих металних јона, чиме се мењају њихова физичко-хемијска својства и потенцијална биолошка примена (11–14). У том смислу, пажњу привлаче деривати, којима су у структуру уграђени хафнијум или цирконијум, елементи високог атомског броја који доприносе повећању електронске густине и потенцијално бољем контрасту у електронској микроскопији (15, 16).

Досадашња истраживања указују да полиоксометалати показују повољне особине у погледу стабилности, ниске токсичности и способности интеракције са биолошким структурама, што их чини посебно интересантним кандидатима за нова, алтернативна контрастна средства (2,17). Ипак, упркос растућем интересовању, подаци о њиховој примени у хистолошком бојењу и трансмисионој електронској микроскопији су и даље ограничени, а систематска испитивања њихове ефикасности, оптималних услова примене и упоредивости са стандардним средствима недовољно су заступљена у литератури. Стога постоји јасна научна потреба да се испита потенцијал полиоксометалата као нове класе контрастних средстава, да се процени њихова ефикасност у визуелизацији ћелијских структура, као и да се утврди да ли могу представљати безбеднију и функционално супериорнију алтернативу постојећим методама бојења у трансмисионој електронској микроскопији.

Радна хипотеза

Полиоксометалати Wells–Dawson-овог типа, захваљујући својој високој електронској густини, структурној стабилности и способности интеракције са биолошким ткивима, могу представљати ефикасна и безбеднија контрастна средства за трансмисиону електронску микроскопију, са потенцијалом да обезбеде квалитет контраста упоредив или супериоран у односу на стандардна контрастна средства, уз очуваност

ультраструктуре и могућност примене у анализи ткивних испечака као и ћелија третираних у *in vitro* условима.

Циљеви истраживања

1. Упоредити ефекте различитих ПОМ-ова Wells–Dawson фамилије: Parent WD POM, Lacunary WD POM, хафнијум-супституисаног (Hf-WD 1:2 POM) и цирконијум-супституисаног (Zr-WD 1:2 POM) у контрастирању ћелијских и субцелуларних структура за потребе трансмисионе електронске микроскопије.
2. Проценити утицај различитих концентрација и различитих времена инкубације различитих полиоксометалата на квалитет контраста и очуваност ултраструктуре ткива.
3. Упоредити квалитет контраста ултратанких препарата добијен применом полиоксометалата са контрастом добијеним применом уранил-ацетата и комерцијалног препарата Uranyless.
4. Проценити могућност примене одабраног полиоксометалата као контраста у испитивању проапоптотског ефекта на ћелијској култури НЕК (Human Embryonic Kidney) у *in vitro* условима.

Материјал и методе

Тип студије

Истраживање ће бити спроведено као експериментална лабораторијска студија.

Место истраживања

Узимање узорака ткива експерименталних животиња биће вршено на Институту за фармакологију, клиничку фармакологију и токсикологију Медицинског факултета Универзитета у Београду. Експерименти на културама ћелија ће се изводити на Институту за биохемију, Медицинског Факултета Универзитета у Београду. Припремање раствора полиоксометалата биће вршено на Институту за хемију у медицини Медицинског факултета Универзитета у Београду. Анализе добијених узорака које су планиране у склопу израде докторске дисертације обавиће се у оквиру Института за хистологију и ембриологију „Александар Ђ. Костић“ Медицинског факултета Универзитета у Београду. Сви експерименти на животињама биће спроведени у складу

са важећим етичким принципима и уз одобрење Комисије за добробит експерименталних животиња Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Протокол експеримента

Истраживање ће се спроводити на биолошким узорцима бубрежног ткива здравих пацова Wistar albino соја, старости 5 недеља и телесне масе око 190 g. Животиње ће бити третиране у складу са стандардним протоколима и институционалним смерницама за негу и коришћење лабораторијских животиња, уз одобрење Комисије за добробит експерименталних животиња. Након завршетка експерименталне процедуре, животиње ће бити хумано жртвоване предозирањем анестетика применом 1 ml 3% (w/v) раствора тиопентон-натријума, у складу са одобреним етичким протоколом, након чега ће бити узорковано бубрежно ткиво за даљу анализу. Животиња. У истраживању ће бити коришћене максимално 3 експерименталне животиње. Број експерименталних животиња биће сведен на минимум неопходан за постизање валидних научних резултата, у складу са принципима 3R (Replacement, Reduction, Refinement). С обзиром да је примарни циљ истраживања методолошка процена контрастних карактеристика полиоксометалата у трансмисионој електронској микроскопији, а не испитивање биолошке варијабилности између јединки, анализа ће бити спроведена на великом броју техничких реплика добијених из стандардизовано припремљених узорака ограниченог броја животиња. На тај начин обезбеђује се поуздано поређење различитих протокола контрастирања уз истовремено смањење употребе експерименталних животиња.

Припрема узорака за трансмисиону електронску микроскопију (ТЕМ)

Узорци ће најпре бити фиксирани 3% глутаралдехидом у какодилатном пуферу у трајању од 24 часа. Након тога, фиксирано ткиво ће бити чувано у какодилатном пуферу и постфиксирано у 1% осмијум-тетраоксиду ради побољшања контраста ткива. Један део узорака бубрежног ткива биће фиксиран искључиво у 3% глутаралдехиду у какодилатном пуферу, без накнадне постфиксације осмијум-тетраоксидом. Након тога, узорци из обе групе биће испрани дестилованом водом и дехидрисани у растућем низу концентрација алкохола. Потом ће ткиво бити инфилтрирано у пропилен-оксид, затим у мешавину пропилен-оксида и епоксидне смоле, и коначно у чистој епоксидној смоли (Sigma-Aldrich). Бубрежно ткиво ће бити сечено на ултратанке пресеке (приближно 70 nm дебљине) помоћу ултрамикротома Leica (Leica Microsystems, Немачка) са

дијамантским ножем. Танки пресеци ће бити постављени на 300-mesh бакарне мрежице (Sigma-Aldrich) и припремљени за даље бојење различитим агенсима (Parent WD POM, Lacunary WD POM, Hf-WD 1:2 POM, Zr-WD 1:2 POM, уранил-ацетат и Uranyless) ради испитивања на трансмисионом електронском микроскопу (Morgagni 268D, FEI, Hillsboro, OR).

Припрема и примена контрастних средстава

Полиоксометалати ће бити растворени у дестилованој води на собној температури, у различитим концентрацијама (0,01 мол/Л и 0,001 мол/Л), непосредно пре наношења на ултратанке пресеке. Кап раствора ће бити нанета на парафилм, након чега ће бакарна мрежица са ултратанких исечком ткива бити постављена на кап. После различитих времена инкубације (1 минут, 15 минута, 20 минута, 30 минута, 1 сат и 24 часа), свака мрежица ће бити испрана дејонизованом водом и припремљена за TEM анализу.

У првом делу експеримента, ултратанки исечци ће бити бојени са четири различита контрастна средства: Parent WD POM ($[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$), Lacunary WD POM ($\alpha_2-[P_2W_{17}O_{61}]^{10-}$), Hf-WD 1:2 POM ($K_{16}[Hf(\alpha_2-P_2W_{17}O_{61})_2] \cdot 19H_2O$) и Zr-WD 1:2 POM ($K_{15}H[Zr(\alpha_2-P_2W_{17}O_{61})_2] \cdot 25H_2O$). Сваки ултратанки исечак ће бити контрастиран једном капи одговарајућег раствора у трајању од 1 минута на собној температури.

У другом делу експеримента биће испитан ефекат примене претходно наведених ПОМ-ова као контраста за електронску микроскопију у различитим временским интервалима: 1 минут, 15 минута, 20 минута, 30 минута, 1 сат и 24 часа. У првом и другом делу експеримента користиће се исечци ткива фиксирани глутаралдехидом и осмијум-тетраоксидом. У трећем делу експеримента упоредиће се контраст добијен употребом полиоксометалата који је у претходна два дела експеримента показао најбоље ефекте контрастирања са контрастом добијеним уранил-ацетатом и Uranyless-ом. За упоређивање ефеката ових контрастних средстава користиће се ултратанки исечци ткива претходно фиксирани само глутаралдехидом. Они ће бити бојени са три различита контрастна средства: полиоксометалат који је у претходна два дела експеримента показао најбоље ефекте контрастирања узорка, биће коришћен у концентрацији и времену који су се показали најоптималнијим, уранил-ацетатом и Uranyless-ом у стандардним концентрацијама. За уранил-ацетат и Uranyless биће припремљени стандардни раствори у складу са препорукама из литературе. Уранил-ацетат ће бити припремљен у

концентрацији од 4% у метанолу, док ће Uranyless бити коришћен према упутству произвођача.

Узгајање ћелијске културе и припрема узорака

Ћелијска линија НЕК (Human Embryonic Kidney) биће коришћена као *in vitro* модел у овом делу истраживања. Ћелије ће бити узгајане у одговарајућем хранљивом медијуму (DMEM) обogaћеном феталним говеђим серумом и антибиотицима, у стандардним условима ћелијске културе, на температури од 37°C и у атмосфери са 5% CO₂. Културе ће се одржавати у стерилним условима, уз редовну контролу морфологије, виталности. По достизању одговарајуће густине раста, ћелије ће бити одвојене са подлоге, ресуспендоване у свежем медијуму и пресејане ради даљег узгајања или припреме за експериментални третман. Након третмана, ћелије ће бити сакупљене центрифугирањем, а добијени ћелијски пелет ће се користити за даљу припрему узорака за трансмисиону електронску микроскопију.

У оквиру експеримента биће формиране две групе ћелијских култура: контролна и третирана. Формирање контролне и третиране групе омогућиће поређење ултраструктурних карактеристика здравих и апоптотичних ћелија, као и процену способности одабраног полиоксометалата да обезбеди адекватан контраст субцелуларних промена карактеристичних за апоптозу. На тај начин биће процењена потенцијална примена полиоксометалата у визуелизацији патолошких промена у *in vitro* условима. Контролна група ће обухватати ћелије узгајане у стандардним условима, без додатног третмана. У третираној групи апоптоза ће бити изазвана применом колхицина (Colchicine, Sigma-Aldrich). Након третмана, ћелије из обе групе биће сакупљене и припремљене за ТЕМ анализу, где ће обе групе бити контрастиране одабраним полиоксометалатом, који је у претходним експерименталним фазама показао најбоље резултате. Узорци ће бити анализирани трансмисионим електронским микроскопом у циљу процене ултраструктурних карактеристика ћелија. Посебна пажња биће усмерена на уочавање морфолошких промена карактеристичних за апоптозу, укључујући кондензацију хроматина, промене у структури једра и цитоплазме, као и формирање апоптотских тела.

Експерименталне групе и поређења

За потребе целокупног истраживања биће коришћени ултратанки исечци бубрежног ткива. Из истог ткивног блока биће припремљен већи број ултратанких пресека који ће

бити коришћени у свим фазама експеримента. Експерименталне групе у овом истраживању су групе ултратанких пресека које се разликују искључиво по примењеном контрастном третману и не представљају групе животиња. Овакав приступ омогућава директно поређење различитих контрастних средстава под идентичним експерименталним условима, уз минимизирање биолошке варијабилности између јединки и смањење броја употребљених животиња, у складу са принципом 3R. У првом делу истраживања биће анализирани ултратанки исечци контрастирани са четири различита полиоксометалата Wells–Dawson-овог типа (Parent WD POM, Lacunary WD POM, Hf-WD 1:2 POM и Zr-WD 1:2 POM), при чему ће се међусобно поредити квалитет контраста и очуваност ултраструктуре. У другом делу истраживања биће испитиван утицај различитих времена инкубације и концентрација одабраних полиоксометалата на квалитет TEM контраста. У трећем делу истраживања, полиоксометалат који покаже најбоље контрастне карактеристике биће упоређен са стандардним контрастним средствима – уранил-ацетатом и препаратом Uranyless. За сваки контрастни третман (одређена врста контрастног средства примењена у одговарајућој концентрацији и током дефинисаног времена инкубације) биће анализирано по 10 TEM фотомикрографија.

ТЕМ анализа

Након бојења, ултратанки пресеци постављени на бакарне мрежице биће анализирани трансмисионим електронским микроскопом (Morgagni 268D, FEI, Hillsboro, OR). Сlike ће бити снимане 16-битном CCD камером са спорим скенирањем при номиналном увећању од 7,1k, ради процене контраста и резолуције постигнуте применом различитих контрастних средстава. Квалитет добијених снимака биће оцењиван на основу јасноће, контраста и резолуције субћелијских структура, посебно једара тубуларних ћелија бубрега. Јасноћа и резолуција снимака биће процењиване на основу степена видљивости и разграничења субцелуларних структура, укључујући мембране, једро, хроматин и цитоплазматске органеле, као и присуства или одсуства артефаката и замућења на TEM снимцима. Квалитативну процену електронских микрографија спровешће три искусна микроскопичара независно један од другог, при чему ће током анализе бити заслепљени за идентитет узорака како би се минимизирала могућност пристрасности. За процену контраста на TEM снимцима биће коришћен однос сигнал–шум (SNR), који ће представљати однос средње вредности сигнала и стандардне девијације шума, као објективан параметар квалитета слике. Анализа ће бити извршена помоћу ImageJ софтвера, при чему ће по контрастном третману бити анализирано укупно 10

фотомикрографија, а добијене вредности SNR биће приказане као средње вредности са стандардном девијацијом. На тај начин ће величина узорка за примарни циљ истраживања износити $n = 10$ снимака по контрастном третману, што ће омогућити поуздано поређење ефеката различитих метода контрастирања.

Статистичка анализа

Резултати истраживања биће обрађени применом метода дескриптивне и аналитичке статистике. Дескрипција нумеричких обележја биће урађена класичним методама описне статистике (аритметичком средином и стандардном девијацијом). У анализи резултата примениће се једнофакторска анализа варијансе (ANOVA), праћена Tukey HSD post-hoc тестом. За корелисање обележја биће коришћен Пирсонов коефицијент корелације. У случају да испитивани параметри не показују нормалну расподелу, биће примењене непараметарске методе, укључујући Mann–Whitney U тест и Kruskal–Wallis тест. Статистичка обрада података биће извршена у програму GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Резултати ће бити приказани као средња вредност $\pm$ стандардна девијација. Ниво статистичке значајности биће постављен на $p < 0,05$.

Процена кандидата о потенцијалном научном доприносу

У овој докторској дисертацији ће по први пут бити систематски испитан потенцијал полиоксометалата као контрастних средстава у трансмисионој електронској микроскопији, кроз анализу њиховог утицаја на визуелизацију ултраструктурних елемената ћелије. Истраживање ће обухватити детаљну процену контрастних карактеристика различитих полиоксометалата Wells–Dawson-овог типа, као и њихово поређење са стандардним контрастним средствима. Применом трансмисионе електронске микроскопије биће омогућена анализа квалитета контраста, јасноће приказа субцелуларних структура и очуваности ултраструктуре ткива, што ће омогућити процену погодности полиоксометалата за примену у хистолошким и електронскомикроскопским истраживањима. Добијени резултати могу потенцијално указати на могућност примене полиоксометалата као нове класе контрастних средстава, која би представљала безбеднију и функционално ефикаснију алтернативу традиционалним уранијумским препаратима. Осим тога, резултати могу допринети бољем разумевању интеракције ових једињења са биолошким структурама и отворити простор за њихову ширу примену у електронској микроскопији и биомедицинским истраживањима. На тај начин би дисертација пружила оригиналан научни допринос у области примене полиоксометалата

и дала потенцијал за даља истраживања и развој нових контрастних средстава у микроскопији.

Референце:

1. Williams DB, Carter CB, Williams DB, Carter CB. The transmission electron microscope. Springer Us; 2009.
2. Nakakoshi M, Nishioka H, Katayama E. New versatile staining reagents for biological transmission electron microscopy that substitute for uranyl acetate. *Journal of electron microscopy*. 2011 Dec 1;60(6):401-7.
3. Hosogi N, Nishioka H, Nakakoshi M. Evaluation of lanthanide salts as alternative stains to uranyl acetate. *Journal of Electron Microscopy*. 2015 Sep 14;64(6):429-35.
4. Čolović MB, Lacković M, Lalatović J, Mougharbel AS, Kortz U, Krstić DZ. Polyoxometalates in biomedicine: update and overview. *Current medicinal chemistry*. 2020 Jan 1;27(3):362-79.
5. Vandebroek L, De Zitter E, Ly HG, Conić D, Mihaylov T, Sap A, Proost P, Pierlout K, Van Meervelt L, Parac-Vogt TN. Protein-Assisted Formation and Stabilization of Catalytically Active Polyoxometalate Species. *Chemistry—A European Journal*. 2018 Jul 17;24(40):10099-108.
6. Roy S, Crans DC, Parac-Vogt TN. Polyoxometalates in catalysis, biology, energy and materials science. *Frontiers in Chemistry*. 2019 Oct 1;7:646.
7. Bijelic A, Aureliano M, Rompel A. The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives. *Chemical Communications*. 2018;54(10):1153-69.
8. Yamase T. Anti-tumor,-viral, and-bacterial activities of polyoxometalates for realizing an inorganic drug. *Journal of Materials Chemistry*. 2005;15(45):4773-82.
9. Kerckhofs G, Stegen S, van Gastel N, Sap A, Falgayrac G, Penel G, Durand M, Luyten FP, Geris L, Vandamme K, Parac-Vogt T. Simultaneous three-dimensional visualization of mineralized and soft skeletal tissues by a novel microCT contrast agent with polyoxometalate structure. *Biomaterials*. 2018 Mar 1;159:1-2.
10. Ma XQ, Xiao HP, Chen Y, Lai QS, Li XX, Zheng ST. Polyoxometalate-based macrocycles and their assembly. *Coordination Chemistry Reviews*. 2024 Jul 1;510:215818.
11. 24. Nowicka D, Vadra N, Wieczorek-Szweda E, Patroniak V, Gorczyński A. Overview of Wells-Dawson Polyoxometalates: from structure and functionalization to application. *Coordination Chemistry Reviews*. 2024 Nov 15;519:216091
12. Rathee B, Wati M, Sindhu R, Sindhu S. Review of Some Applications of Polyoxometalates. *Oriental Journal of Chemistry*. 2022;38(2):327.
13. Stojanović M, Lalatović J, Milosavljević A, Savić N, Simms C, Radosavljević B, Četković M, Kravić Stevović T, Mrda D, Čolović MB, Parac-Vogt TN. In vivo toxicity evaluation of a polyoxotungstate nanocluster as a promising contrast agent for computed tomography. *Scientific Reports*. 2023 Jun 5;13(1):9140.
14. Stojanović M, Čolović MB, Lalatović J, Milosavljević A, Savić ND, Declerck K, Radosavljević B, Četković M, Kravić-Stevović T, Parac-Vogt TN, Krstić D. Monolacunary Wells-Dawson Polyoxometalate as a Novel Contrast Agent for Computed Tomography: A Comprehensive Study on In Vivo Toxicity and Biodistribution. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Feb 22;25(5):2569.

15. 34Bhattacharjee R, Hare ET, Miro P. Structure, Properties, and Reactivity of Polyoxocationic Zirconium and Hafnium Clusters: A Computational Investigation. *Inorganic chemistry*. 2023 Mar 23;62(13):5081-7.
16. Li HL, Lian C, Yang GY. A Zr-added Dawson-type poly (polyoxometalate). *Dalton Transactions*. 2023;52(4):857-61.
17. de Bournonville S, Vangrunderbeeck S, Ly HG, Geeroms C, De Borggraeve WM, Parac-Vogt TN, Kerckhofs G. Exploring polyoxometalates as non-destructive staining agents for contrast-enhanced microfocus computed tomography of biological tissues. *Acta Biomaterialia*. 2020 Mar 15;105:253-62.