

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВВЕДЕНИЯ МЕТКИ ИОДА-123 В МОЛЕКУЛУ DARPin(HE)₃-Ec1 ПРЯМЫМ СПОСОБОМ

В.В. Боденко

Научный руководитель – д.фарм.н., профессор М.В. Белоусов

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»
634050, Россия, г. Томск, проспект Ленина, дом 30, bodenkovitalina@gmail.com

На сегодняшний день радиофармацевтические препараты являются перспективным направлением в диагностике и терапии онкологических заболеваний.

Для соединения с радиоактивными изотопами активно используется новый класс нацеливающих молекул DARPin (Design Ankyrin Repeat Protein). DARPins – диагностический и терапевтический агент, анкириновый повторный белок, каркас которого состоит из трех или четырех повторов из 33 аминокислот, содержащих β-виток и две антипараллельные α-спирали. Преимущества DARPins: обладают малыми размерами, что способствует большому скоплению в опухолях и быстрому выведению из крови и нормальных тканей, что обеспечивает высококонтрастное изображение опухолей вскоре после инъекции, а также высокая специфичность и аффинность к антигену, стабильная структура, а также низкая стоимость производства, обусловленная их экспрессией в бактериальных средах [1].

Исследуемый в данной работе DARPin(HE)₃-Ec1 связывается с молекулой адгезии эпителиальных клеток (EPCAM) с очень высоким сродством [2]. EPCAM – это трансмембранный белок, имеет онкогенный потенциал, гиперэкспрессирован при нескольких типах рака, таких как аденокарцинома поджелудочной железы, рак яичников и груди. EPCAM является активно исследуемой и многообещающей терапевтической мишенью [3].

Целью работы является оптимизация методики введения метки иода-123 в молекулу DARPin(HE)₃-Ec1 прямым способом

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали раствор DARPin(HE)₃-Ec1. Визуализацию радиохроматограмм проводили с помощью ТСХ-сканера («ELYSIA Raytest. Model: Gamma BGO-V, Detector+miniGita, Германия), для измерения радиоактивности использовали дозкалибратор АТОМЛАВ 500 (Biodex). Реактивы Fluka, Acros

Organics, Panreac, Sigma Aldrich. Для очистки DARPin(HE)₃-Ec1 применяли картриджи для гель-фильтрации (эксклюзионной хроматографии) с G25 NAP-5 (GE Healthcare, Швейцария). К 26 мкл предварительно очищенного раствора DARPin(HE)₃-Ec1 (~4 мг/мл, 5,561 ммоль, m~100 мкг) добавляли 200 мкл раствора иода-123 (с активностью 100 МБк), предварительно нейтрализованным 20 мкл 0,1 М HCl. Затем добавляли 50 мкл раствора хлорамин-Т (2 мг/мл в PBS, ~175,56 нмоль). Инкубировали, перемешивая, при комнатной температуре в течение 120 с. Далее добавляли 50 мкл раствора метабисульфит натрия (4 мг/мл в PBS), тщательно перемешивали, измеряли активность. Эксперимент проводили в 2 повторах. Полученные растворы очищали, используя колонки NAP-5, предварительно уравновешенные PBS. Радиохимический выход и чистоту определяли с использованием тонкослойной хроматографии с использованием iTLC-бумаги в среде ацетон : вода (4 : 1).

После получения препарата DARPin(HE)₃-Ec1 проверяли стабильность полученного комплекса: к 2 пробам по 50 мкл препарата DARPin(HE)₃-Ec1 добавляли 255 мкл раствора калия иодида, также к 2 пробам по 50 мкл препарата добавляли 255 мкл раствора PBS.

Результаты. Установлено, что в условиях инкубации 120 сек при комнатной температуре на 100 мкг DARPin(HE)₃-Ec1 необходимо 200 мкл раствора изотопа ¹²³I (с активностью 100 МБк, pH=7) и 50 мкл раствора хлорамин-Т (2,0 мг/мл в PBS). Для прекращения реакции необходимо добавить 50 мкл раствора метабисульфита натрия (4,0 мг/мл в PBS). Радиохимический выход более 79% (изолированный выход составил более 65%) при радиохимической чистоте около 100% после очистки гель-фильтрацией.

Таким образом, на основании полученных данных была предложена методика введения метки иода-123 в молекулу DARPin(HE)₃-Ec1 прямым способом.

Список литературы

1. Чернов В.И., Медведева А.А., Синилкин И.Г., Зельчан Р.В., Брагина О.Д. и др. // *Инновационные радиофармпрепараты для онкологии: разработки Томского национального исследовательского медицинского центра. Злокачественные опухоли, 2017. – Т. 7. – №3. – спецвыпуск 1. – С. 52–56.*
2. Deyev S.M., Vorobyeva A., Schulga A // *Effect of a radiolabel biochemical nature on tumor-targeting properties of EpCAM-binding engineered scaffold protein DARPIn Ec1. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. – Vol. 145. – P. 216–225.*
3. Vorobyeva A., Konovalova E., Xu T. // *Feasibility of Imaging EpCAM Expression in Ovarian Cancer Using Radiolabeled DARPIn Ec1. International Journal of Molecular Sciences, 2020. – Vol. 21. – №9. – P. 3310.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФА ПО ОТНОШЕНИЮ К ГИДРОКСИЛ-РАДИКАЛУ

К.А. Братишко^{1,2}, М.В. Зыкова², А.А. Уфандеев²

Научный руководитель – д.х.н., профессор, проректор по науке НИ ТПУ М.С. Юсубов

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, проспект Ленина, 30

²Сибирский государственный медицинский университет
634050, Россия, Московский тракт, 2, Kr-1295@mail.ru

Окислительный стресс – это патологическое состояние организма, при котором наблюдается смещение баланса между прооксидантной и антиоксидантной системами в сторону избыточного образования или недостаточной элиминации опасных высоко реакционноспособных кислородных частиц. На сегодняшний день выявлено семь наиболее опасных высоко реакционноспособных кислородных частиц. В ходе длительной эволюции клетки организма выработали эндогенную систему обезвреживания данных активных форм кислорода (АФК) за счет эндогенных антиоксидантов и ферментов антиперекисной защиты. Несмотря на это, гидроксильные радикалы (НО•), образующиеся при взаимодействии Fe^{2+} с H_2O_2 в ходе реакции Фентона в окислительно-восстановительном цикле, все же остаются наиболее опасными кислородными радикалами для организма человека, поскольку в клетках не выработаны ферменты для обезвреживания именно данного вида АФК. Поэтому поиск природных молекул, способных ингибировать НО• является на сегодняшний день важной и актуальной задачей. Перспективной группой таких веществ являются гуминовые кислоты (ГК) торфа.

Таким образом, целью исследования является оценка способности ГК торфа ингибировать НО• в модельной системе *in vitro*.

Объектами исследования являлись ГК 8 различных видов торфа, из которых 4 верховых и 4 низинных вида, выделенные 0,1 моль/л раствором натрий гидроксида (ГКу) и 0,1 моль/л натрий пиродифосфата (ГКл). Генерацию НО• осуществляли в реакции Хабера-Вейса в присутствии дезоксирибозы [1]. Под влиянием НО• происходила деградация дезоксирибозы до малонового диальдегида (МДА). Последний определяли по реакции взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре и кислом рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 532 нм. В связи с наличием высокой хелатирующей активности образцов ГК, необходимо учитывать возможность связывания Fe^{3+} с молекулами ГК, что может привести к снижению концентрации НО•. Известно, что ЭДТА связывает ионы Fe^{3+} в комплекс, который способен генерировать НО•, поэтому способность ГК связывать НО• была изучена в модельной системе с ЭДТА и без ЭДТА. В опытные пробы добавляли растворы образцов ГК в конечных концентрациях: 0,5; 1; 1,5; 2 мг/мл. На основании кривой зависимости «доза-эффект» рассчитывали концентрацию образца ГК, при которой наблюдалось 50% ингибирование НО•. В качестве эталона был использован маннитол (Acros Organics, China) – классическая ловушка НО•.