

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННОЙ ТРИТИЕМ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ТЕРМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ТРИТИЯ

© 2021 г. А. В. Синолиц, М. Г. Чернышева, Г. А. Бадун*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
e-mail: badunga@yandex.ru

Получена 28.03.2020, после доработки 28.03.2020, принята к публикации 15.04.2020

Показана принципиальная возможность получения меченой тритием гиалуроновой кислоты с помощью метода термической активации. Рассматривается влияние условий подготовки препаратов и проведения реакции изотопного обмена на удельную активность меченого продукта и равномерность распределения трития по молекулам с разной молекулярной массой. Показано, что при мягких условиях проведения эксперимента и двойной диализной очистке препаратов (перед и после введения трития) удастся получить меченую тритием гиалуроновую кислоту с удельной активностью 26–52 ГБк/г без существенного изменения молекулярно-массового распределения.

Ключевые слова: тритий, гиалуроновая кислота, метод термической активации трития, меченые соединения

DOI: 10.31857/S0033831121040122

Гиалуроновая кислота (ГК) – природный биополимер, состоящий из остатков *D*-глюкуроновой кислоты и *D*-*N*-ацетилглюкозамина, соединенных поочередно β -1,4- и β -1,3-гликозидными связями. ГК применяется в косметологии и регенеративной медицине [1], обладает высоким сродством к биологическим тканям, в которых содержится в значительном количестве [2]. Обнаружено, что ГК также обладает высоким сродством к рецепторам CD44, которые переэкспрессируются клетками некоторых видов рака и локализуются на их поверхности [3, 4]. Известно о модификации поверхности углеродных наноматериалов гиалуроновой кислотой. Частицы углерода луковичной структуры, нековалентно модифицированные ГК, лучше захватывались раковыми клетками [5]. Таким образом, с помощью ГК возможно улучшить средства доставки лекарственных препаратов или диагностических средств для терапии или диагностики рака на основе углеродных наноматериалов.

ГК можно определять спектрофотометрически в комплексе с ферментом по модифицированному методу Морган–Эльсона [6], однако этот подход сильно осложняется для окрашенных образцов и в присутствии веществ, обладающих схожими с ГК химическими свойствами. Для определения ГК в сложных объектах, включая живые системы, можно использовать радиоактивные индикаторы в составе лигандов, образующих комплекс с ГК [7]. Известно о введении трития в ГК методом Вильцбаха, однако при этом образуется большой набор меченых тритием олигомеров, отличающийся по составу от исходного препарата [8].

Для введения радиоактивной метки непосредственно в ГК видится перспективным метод термической активации трития [9]. При использовании мягких условий проведения реакции удастся получить меченные тритием биополимеры и природные смеси сложного неопределенного состава без изменения их физико-химических свойств [10]. С помощью этого метода успешно вводили тритий в саха-

ра и соединения на их основе [11, 12]. С помощью данного метода удалось получить меченный тритием хитозан (M_w 210 кДа) с удельной активностью 9.5 ТБк/ммоль [13], что позволило использовать его для количественного определения связывания с коллагеновыми матрицами и следить за сохранностью получаемых покрытий в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* [14].

При разработке методик введения трития в ГК с помощью метода термической активации трития необходимо учитывать свойства этого соединения. ГК очень хорошо растворима в воде, при высокой концентрации сильно повышает вязкость. Вода прочно удерживается молекулами ГК, поэтому полное удаление воды при высушивании практически невозможно и может влиять на результат взаимодействия препаратов ГК с атомами трития при проведении реакции изотопного замещения водорода. Известно, что ГК при длительном хранении в водных растворах способна уменьшать молекулярную массу за счет гидролиза гликозидных связей. Этот процесс ускоряется при повышении температуры выше 60°C, в присутствии сильных кислот и под действием ультразвука [15, 16]. Препараты ГК получают из различных природных источников, и они отличаются не только средней молекулярной массой, но и стабилизирующими компонентами, которые также будут вступать в реакцию с атомами трития. Цель данной работы заключалась в определении условий получения меченной тритием ГК с помощью метода термической активации трития.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ГК в форме натриевых солей производства Lifecore (препараты с средней молекулярной массой (M_w) 100 и 200 кДа), Atomashka (препарат M_w 350 кДа).

Для подготовки препаратов к введению трития в первой серии экспериментов их растворяли в воде и использовали без дополнительной очистки. Для повышения эффективности введения трития во второй серии экспериментов препараты подвергали предварительной очистке с помощью диализа от 21 до 28 сут через мембрану MWCO 8–10 кДа Float-A-Lyzer G2 (Spectra/Por) против дистиллированной воды при температуре 4°C.

Для введения трития в препараты гиалуроновой кислоты в реакционный сосуд вносили раствор, содержащий 1 мг ГК, равномерно распределяли его по внутренней поверхности, быстро замораживали при охлаждении жидким азотом и удаляли воду лиофилизацией. Продолжительность лиофилизации изменяли в пределах от 30 до 75 мин. Далее сосуд с пленкой вещества на внутренней поверхности подсоединяли к установке для работы с газообразным тритием и удаляли воздух до остаточного давления 0.005 Па в течение 30–60 мин при комнатной температуре стенок сосуда, а также при нагревании в водяном термостате до 80°C. Затем стенки реакционного сосуда охлаждали жидким азотом, заполняли сосуд газообразным тритием до давления 0.5 Па и инициировали реакцию изотопного обмена нагреванием вольфрамовой проволоки электрическим током до температуры 1730–1960 К.

Меченное тритием вещество смывали со стенок реактора 4 мл воды. После выдерживания не менее 1 сут раствор упаривали досуха на ротаторном испарителе. На всех стадиях работы определяли радиоактивность растворов с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра RackBeta 1215. Для дополнительной очистки от лабильной метки и низкомолекулярных продуктов реакции использовали диализ через мембрану Serva MWCO 12 кДа и с помощью диализной системы Float-A-Lyzer G2 (Spectra/Por) с мембраной MWCO 8–10 кДа против дистиллированной воды при температуре 4°C в течение 7 сут.

Для определения молекулярно-массового состава препаратов ГК и распределения трития по компонентам проводили гель-проникающую хроматографию на хроматографе Waters с УФ детектором. Анализ проводили с использованием хроматографической колонки Ultrahydrogel 1000 размером 300 × 7.8 мм, заполненной гелем на основе гидроксилат-полиметакрилата с размером пор 1000 Å (Waters). В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буфер состава K_2HPO_4 6.303 г/л, KH_2PO_4 0.513 г/л (pH 7.7 ± 0.1). Регистрацию компонентов ГК в элюате проводили с помощью УФ детектора при длине волны 210 нм. Фракции элюата собирали и измеряли их радиоактивность.

Особенности подготовки препаратов ГК к введению трития и условия их очистки приведены в табл. 1. Удельную активность очищенных препа-

Таблица 1. Подготовка препаратов ГК к введению трития и условия их очистки

Параметры введения трития и активность [^3H]гиалуроновой кислоты								
номер препарата	M_w , кДа	варьируемые параметры подготовки препаратов и проведения реакции изотопного обмена				изменение активности препарата при очистке, A_i/A_0		удельная активность препарата ^a , ГБк/г
		предварительный диализ, сут	лиофилизация мишени, мин	вакуумирование мишени, мин	$T_{\text{атомизатора}}, \text{K}$	после удаления лабильной метки	после диализной очистки	
1	100	–	30	30	1850	9%	4%	20
2	350	–	30	30	1850	16%	6%	14
3	100	21	50	60	1850	28%	21%	43
4	350	21	75	60	1850	39%	31%	52
5	200	28	75	60	1960	40%	22%	7 (65 ^b)
6	200	28	75	60	1850	40%	16%	49
7	200	28	75	60	1730	53%	27%	26

^aУдельная активность нормирована на исходное содержание трития в газе.^b В составе низкомолекулярных фракций препарата.

ратов рассчитывали для основного пика профиля радиоактивности. Так как при введении трития в ГК использовали протий-тритиевые смеси с содержанием трития от 20 до 80%, удельную активность нормировали на исходное содержание трития в смеси.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения реакции с атомарным тритием использовали температуру мишени 77 К и давление газа 0.5 Па, когда для большинства химических соединений образование побочных продуктов минимально. Продолжительность атомизации трития на вольфрамовой проволоке составляла 10 с, что также способствовало уменьшению образования побочных продуктов. Температуру атомизатора изменяли от 1730 до 1960 К.

Содержание связанной воды является важным условием, влияющим на удельную активность пре-

паратов ГК. Поэтому на первом этапе работы исследовали влияние продолжительности лиофильной сушки (остаточное давление около 1 Па) и последующего вакуумирования с помощью диффузионного насоса (остаточное давление 0.005 Па) на долю трития в лабильной форме. Оказалось, что доля трития в лабильной форме уменьшается при увеличении продолжительности вакуумирования мишени с 30 до 60 мин на каждой стадии подготовки препаратов. В предварительных экспериментах было также показано, что использование нагревания стенок реактора до 80°C при вакуумировании приводит к увеличению доли меченых низкомолекулярных фракций, вероятно за счет деполимеризации препарата при таком режиме высушивания. Поэтому при подготовке препаратов нагревание в дальнейшем не использовали.

Анализ с помощью ВЭЖХ меченых препаратов после упаривания растворов досуха показал, что, помимо пика по радиоактивности, который

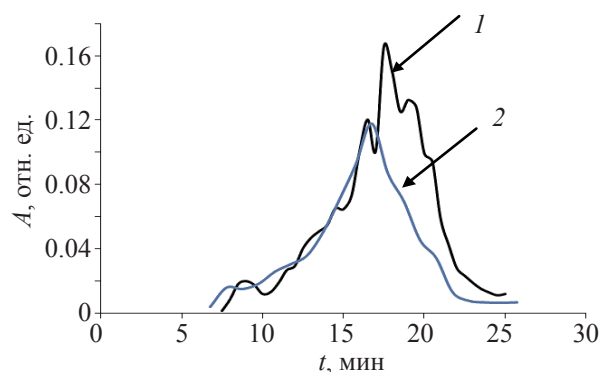


Рис. 1. Профили активности при ВЭЖХ препарата № 1: 1 – после удаления лабильной метки упариванием раствора, 2 – после диализной очистки.

соответствует времени выхода основной фракции ГК, наблюдаются дополнительные пики, соответствующие меньшей молекулярной массе. Диализная очистка препарата через мембраны MWCO 8–10 кДа приводила к удалению низкомолекулярных фракций. На рис. 1 представлены профили активности элюата препарата ГК 100 кДа до диализной очистки и после нее (табл. 1, препарат № 1).

Кинетика изменения активности меченых препаратов при диализе показана на рис. 2. Упариванием досуха внешнего раствора было показано, что в первые 3 сут диализа происходит преимущественно переход через мембрану тритиевой воды, а при больших сроках диализа возрастает доля радиоактивности в низкомолекулярных компонентах,

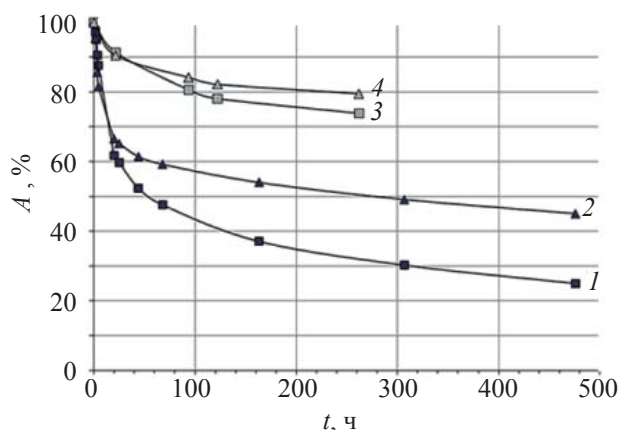


Рис. 2. Изменение активности препаратов $[^3\text{H}]\text{ГК}$ во время диализа. Препарат: 1 – №1 (M_w 100 кДа без предварительного диализа), 2 – №2 (M_w 350 кДа без предварительного диализа), 3 – №3 (M_w 100 кДа с предварительным диализом), 4 – №4 (M_w 350 кДа с предварительным диализом).

которые не удаляются при высушивании раствора. Существенного изменения молекулярно-массового распределения препарата, определяемого по оптическому поглощению элюата, не было зафиксировано. Это было подтверждено в независимом эксперименте, когда исходный препарат ГК (M_w 350 кДа) хранился при 4°C в течение 60 и 90 сут (рис. 3). Вероятно, при диализе удаляются сопутствующие низкомолекулярные компоненты, однако, нельзя

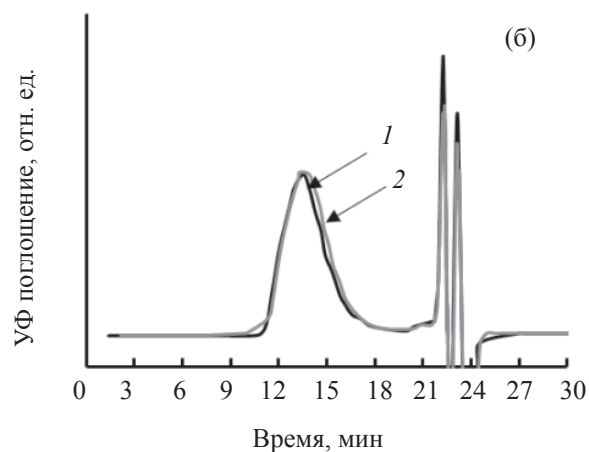
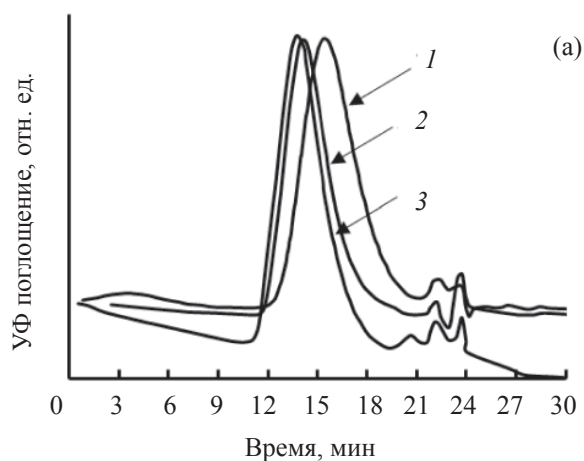


Рис. 3. Хроматографические профили препаратов ГК. (а) 1 – препарат №3 (100 кДа), 2 – препарат №6 (200 кДа), 3 – препарат №4 (350 кДа); (б) немеченый препарат ГК (350 кДа) после хранения в водном растворе при 4°C 60 (1) и 90 сут (2).

исключать их образование в процессе обработки препаратов атомами трития.

Для выяснения того, присутствуют ли низкомолекулярные компоненты в препарате изначально и как они влияют на удельную активность очищенного препарата, провели предварительную диализную очистку препаратов в течение 28 сут. Такая предварительная подготовка позволила уменьшить активность продуктов, удаляемых при диализе (рис. 2), а удельная радиоактивность очищенного препарата возросла (табл. 1).

Для выяснения того, как влияет температура вольфрамовой проволоки (T_w) на эффективность введения трития в ГК для препарата M_w 200 кДа (табл. 1, препараты 5–7,), провели эксперименты при температуре атомизатора $T_w = 1730, 1850$ и 1960 К. Препарат предварительно очищали от сопутствующих компонентов диализом в течение 21 сут. После введения трития удаляли лабильную метку упариванием растворов, а затем проводили диализ в течение 7 сут. Профили активности очищенных препаратов приведены на рис. 4.

Для препаратов, обработанных атомами трития, полученными при температуре атомизатора 1730 и 1850 К, наблюдался один пик по активности, совпадающий с пиком по УФ поглощению элюата. При анализе препарата, полученного при температуре атомизатора 1960 К, пик по активности соответствовал молекулярной массе меньшей, чем в исходном препарате. Таким образом, использование жестких условий введения трития ($T_w = 1960$ К) приводит к фрагментации молекул биополимера. Хотя от фрагментированных молекул можно избавиться с помощью диализа или фильтрацией препарата через мембрану с соответствующим диаметром пор, для получения препаратов с максимально близким к исходному составу не рекомендуется использовать такой температурный режим.

В ходе проведенной работы было показано, что метод термической активации является удобным способом получения меченной тритием гиалуроновой кислоты. Определены основные факторы, позволяющие ввести тритий в ГК с сохранением ее свойств и повысить удельную активность $[^3\text{H}]\text{ГК}$. Для этого требуется предварительная очистка ГК от низкомолекулярных компонентов с помощью диализа водных растворов при 4°C . При подготовке к

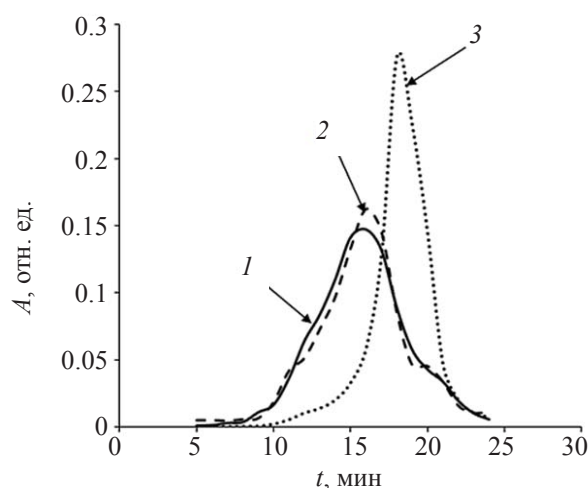


Рис. 4. Профили активности препаратов $[^3\text{H}]\text{ГК}$ (препараты № 5–7), полученных при температуре вольфрамовой проволоки, К: 1 – 1730 , 2 – 1850 , 3 – 1960 .

введению трития необходимо максимально удалить воду из препаратов вакуумированием при остаточном давлении 0.005 Па в течение не менее 1 ч, однако без нагрева, чтобы избежать деполимеризации. Обработку препаратов атомами трития следует проводить при температуре мишени 77 К и давлении трития 0.5 Па в течение 10 с. Для уменьшения фрагментации молекул температура атомизатора должна быть не выше 1850 К. Для удаления лабильной метки и низкомолекулярных меченых фрагментов можно использовать диализ в течение 7 сут при 4°C .

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность д.б.н. И.Д. Гроздовой, д.х.н. Н.С. Мелик-Нубарову, к.ф.-м.н. И.С. Чашину за предоставление препаратов и полезное обсуждение.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-33-20147-мол-а-вед и № 19-33-90151).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bukhari S.N.A., Roswandi N., Waqas M. et al. // Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 120. P. 1682–1695.
2. *Schaefer L., Schaefer R.M. // Cell Tissue Res.* 2010. Vol. 339. P. 237–246.
3. *Dosio F., Arpicco S., Stella B., Fatta E. // Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. Vol. 97. P. 204–236.
4. *Edelman R., Assaraf Y.G., Levitzky I. et al. // Oncotarget.* 2017. Vol. 8. P. 24337–24353.
5. *d'Amora M., Camisasca A., Boarino A. et al. // Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2020. Vol. 188. 110779.
6. *Pepeliaev S., Hrudíková R., Jilková J. et al. // Eur. Polym. J.* 2017. Vol. 94. P. 460–470.
7. *Laurent B.G., Tengblad A. // Anal. Biochem.* 1980. Vol. 394. P. 386–394.
8. *Highsmith S., Chipman D.M. // Anal. Biochem.* 1974. Vol. 566. P. 557–566.
9. *Badun G.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L. // Radiochim. Acta.* 2012. Vol. 100. P. 401–408.
10. *Badun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A. et al. // Radiochim. Acta.* 2010. Vol. 98. P. 161–166.
11. *Бадун Г.А., Ксенофонтов А.Л., Лукашина Е.В. и др. // Радиохимия.* 2005. Т. 47, № 3. С. 281–283.
12. *Сидоров Г.В., Бадун Г.А., Баумова Е.А. и др. // Радиохимия.* 2005. Т. 47, № 3. С. 284–288.
13. *Gallyamov M.O., Chaschin I.S., Khokhlova M.A. et al. // Mater. Sci. Eng. C.* 2014. Vol. 37. P. 127–140.
14. *Gallyamov M.O., Chaschin I.S., Bulat M. et al. // J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2018. Vol. 106. P. 270–277.
15. *Simulescu V., Kalina M., Mondek J., Pekař M. // Polym. Degrad. Stab.* 2015. Vol. 111. P. 257–262.
16. *Mondek J., Kalina M., Simulescu V., Pekař M. // Polym. Degrad. Stab.* 2015. Vol. 120. P. 107–113.