

Гуанозин взвешивали во флаконы и растворяли в 2 мл дистиллированной воды с последующим добавлением 100 мкл 1% или 0.1% раствора KCl. Образование гелей регистрировали через 48 часов. Устойчивость гелей, образованных в растворах гуанозина с различной концентрацией в присутствии KCl в концентрации 0.1% и 1% контролировали визуально путём появления или отсутствия сползания образовавшегося во флаконе геля белого цвета по стенкам флакона при переворачивании флакона пробкой вниз. На фотографиях перевёрнутых флаконов с гелем, образовавшимся в них при использовании различной концентрации гуанозина и количества добавленного в систему раствора KCl, видно, что устойчивый гель образуется уже при концентрации гуанозина 71 ммоль/л (таблица). При этом видно, что при такой концентрации гуанозина количество добавляемого в раствор KCl не влияет на его устойчивость.

В результате квантово-химического моделирования установлено, что между молекулами гуанозина в комплексе «гуанозин-гуанозин» в процессе гелеобразования возникают две водородные связи длиной 2.2 Å и 2.1 Å. Визуальный анализ устойчивости образующихся гелей в растворах гуанозина при различной концентрации гуанозина и добавляемого в систему раствора KCl свидетельствует о преимущественном влиянии на устойчивость геля концентрации гуанозина. Десятикратная разница в количестве хлорида калия, добавляемого в систему, практически не влияет на устойчивость геля. Механически устойчивый гель образуется уже при концентрации гуанозина 71 ммоль/л, и его устойчивость растёт с увеличением концентрации нуклеозида. Таким образом, использование различной концентрации растворяемого гуанозина позволяет регулировать степень устойчивости и плотности образующегося геля.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bhattacharyya, T.* Guanosine-Derived Supramolecular Hydrogels: Recent Developments and Future Opportunities / T. Bhattacharyya [et al.] // ACS Omega. – 2018. – Vol.3. – P. 2230–2241.
2. *Carducci, F.* On the structural stability of guanosine-based supramolecular hydrogels / F. Carducci [et al.] // Soft Matter. – 2018. – P. 1–12.
3. *Hu, J.* G-quadruplex-based antiviral hydrogels by direct gelation of clinical drugs / J. Hu [et al.] // Mater. Chem. Front. – 2019. – Vol. 3. – P. 1322–1327.
4. *Shahab, S.* Synthesis, geometry optimization, spectroscopic investigations (UV/Vis, excited states, FT-IR) and application of new azomethine dyes / S. Shahab [et al.] // J. of Molecular Structure. – 2017. – Vol. 1148. – P. 134–149.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ АПОФЕРРИТИНА OBTAINING AND IMMUNOCHEMICAL TESTING OF APOFERRITIN

Н. С. Чумак¹, Я. И. Мельникова¹
N. Chumak², Y. Melnikova²

¹Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

kaf_immunal@iseu.by, nataliachumak75@gmail.com

¹Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Экспериментально изучен процесс прямого связывания моноклональных антител с апоферритином, иммобилизованным на полистироле, а также метод конкурентного взаимодействия моноклональных антител с апоферритином, находящимся в растворе. Установлено, что иммобилизация апоферритина на полистирольной поверхности приводит к изменению эпитопной структуры данного белка и к устранению реактивных эпитопов связывания моноклональных антител. Растворимая форма апоферритина эффективно связывается с моноклональными антителами в конкурентном анализе, что подтверждает конформационный характер кластеров детерминант на поверхности апоферритина.

The process of direct binding of monoclonal antibodies to apoferritin immobilized on polystyrene, as well as the method of competitive interaction of monoclonal antibodies with apoferritin in solution, have been experimentally studied. It was found that the immobilization of apoferritin on a polystyrene surface leads to a change in the epitope structure of this protein and to the elimination of reactive epitopes of binding of monoclonal antibodies. The soluble form of apoferritin effectively binds to monoclonal antibodies in a competitive assay, which confirms the conformational nature of the clusters of determinants on the surface of apoferritin.

Ключевые слова: апоферритин, моноклональные антитела, полистирол, прямое связывание, конкурентный анализ.

Keywords: apoferritin, monoclonal antibodies, polystyrene, direct binding, competitive assay.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-1-289-293>

На сегодняшний день нашла экспериментальное подтверждение теория о повсеместной распространённости апоферритина в самых различных органах для всех млекопитающих.

Апоферритин – белок, способный к связыванию железа в виде комплексного соединения его гидроокиси и фосфорной кислоты. Обеспечивает всасывание железа в кишечнике, а также депонирование железа в организме; содержится в печени, селезёнке и слизистой оболочке кишечника.

Благодаря своим превосходным свойствам противостоять различным воздействиям окружающей среды, апоферритины могут устранять раннее высвобождение своей нагрузки и, таким образом, защищать ткани от неблагоприятного воздействия различных терапевтических агентов. Более того, катионная природа внешней поверхности протеина делает возможной простую модификацию поверхности для повышения специфичности переносчика [1].

Способность апоферритина к самосборке широко используется в области наномедицины, поскольку белковая клетка может обратимо разъединяться в неблагоприятных условиях, а после изменения окружающей среды условия могут восстанавливаться в обратном направлении, сохраняя терапевтический агент в своей полости. Те же принципы применяются и для включения контрастных веществ в протоколы визуализации. Эта естественная способность имеет множество преимуществ: полученные наночастицы образуют полости одинакового размера, и, таким образом, инкапсуляция груза может быть легко воспроизводимой [2].

Цель настоящего исследования - иммунохимическое тестирование сложного мультисубъединичного апобелка – апоферритина. Для этого изучить взаимодействие панели моноклональных антител с иммобилизованным на полистироле апоферритином, а также провести иммунохимическое тестирование апоферритина, находящегося в растворе, с помощью панели моноклональных антител [3].

Материалы и методы исследований. Ферритин из селезенки человека получали методом, включающим фракционирование гомогената постмортальной ткани сульфатом аммония, ультрацентрифугирование и гель-хроматографию на носителе Toyoreag1 HW-55. Апоферритин получали диализом селезеночного ферритина против 1%-ной тиогликолевой кислоты, pH 5,5, с последующим диализом против 0,1 М натрий-боратного буфера, pH 8,5.

Для получения моноклональных антител мышей линии BALB/c иммунизировали путем многократного введения ферритина, выделенного из селезенки человека, внутривенно в полном адьюванте Фрейнда, по 100 мкг на 1 инъекцию с интервалом в 14 дней.

Для иммобилизации белков на полистирольных планшетах в лунки полистирольных планшетов (“Nunc”, Дания; “Linbro”, США либо “Titertek”, Финляндия) вносили белок (ферритин или антитела) в количестве 0,5 мкг на 1 лунку в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, и инкубировали 16 ч при 4°. Затем планшеты промывали 0,05 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,2 М CaCl₂ (ФСБ) и 0,05%-ный твин-20 (ФСБТ), и добавляли 1%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ. Через 1 ч планшеты промывали ФСБТ и использовали в анализе. Количество иммобилизованного белка определяли иммунохимически по убыли из исходного раствора. Адсорбция ферритина в описанных условиях составляет -100 нг на 1 лунку.

Взаимодействие моноклональных антител с иммобилизованным апоферритином. В лунках полистирольных планшетов иммобилизовали апоферритин по стандартной методике. Возрастающие количества моноклональных антител в объеме 0,2 мл ФСБТ-БСА инкубировали с антигеном в течение 1,5 ч, промывали ФСБТ; образующиеся на твердой фазе комплексы моноклональных антител с антигеном проявляли с помощью конъюгата анти-IgG-ПХ. Ферментативную активность, связанную с твердой фазой, определяли спектрофотометрически, по стандартной методике, измеряя оптическую плотность при 492 нм после 10 мин инкубации при комнатной температуре в среде, содержащей 0,1 %-ный ортофенилендиамин, 0,05%-ную H₂O₂ и 0,1%-ный цитрат натрия, pH 4,5. Реакцию останавливали, добавляя в лунки 10%-ную серную кислоту.

Конкурентный анализ связывания растворимого апоферритина с моноклональными антителами. В лунки полистирольных планшетов с предварительно иммобилизованным селезеночным ферритином человека добавляли возрастающие количества апоферритина (от 250 до 3000 нг в пробе) в ФСБТ-БСА, а затем 100 нг конъюгата моноклональных антител F11c биотином или 50 нг конъюгата моноклональных антител C5 или G10 биотином в объеме 0,2 мл. Инкубировали в течение 1,5 ч, промывали ФСБТ и вносили 200 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидазы в разведении 1 : 1000. Через 1,5 ч инкубации лунки промывали и ферментативную активность определяли спектрофотометрически по стандартной методике, измеряя оптическую плотность при 492 нм после 10 мин инкубации при комнатной температуре в среде, содержащей 0,1 %-ный ортофенилендиамин, 0,05%-ную H₂O₂ и 0,1%-ный цитрат натрия, pH 4,5. Реакцию останавливали, добавляя в лунки 10%-ную серную кислоту.

Результаты исследований и их обсуждение. Для установления специфичности моноклональных антител к эпитопам апоферритина нами исследовано взаимодействие трёх моноклональных антител с иммобилизованным на полистироле апоферритином.

Экспериментальная система включала иммобилизованный в лунках полистирольного планшета апоферритин и возрастающие количества меченых биотином моноклональных антител F11 или C5 или G10.

Проявление образовавшихся иммунных комплексов «антиген-антитело» на твердой фазе проводили с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой.

Зарегистрированное в наших экспериментах отсутствие связывания иммобилизованного апоферритина панелью моноклональных антител может быть свидетельством наличия на молекуле апоферритина эпитопов конформационного характера (Рис. 1,2,3).

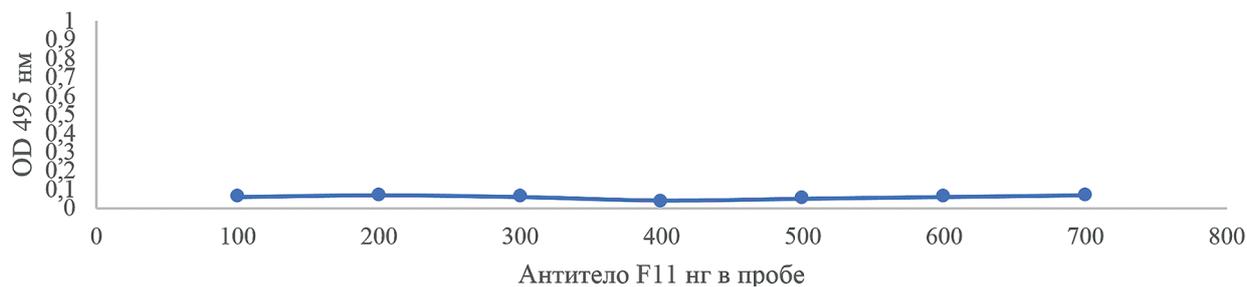


Рисунок 1 – Прямое связывание моноклональных антител F11 с иммобилизованным на полистироле апоферритином

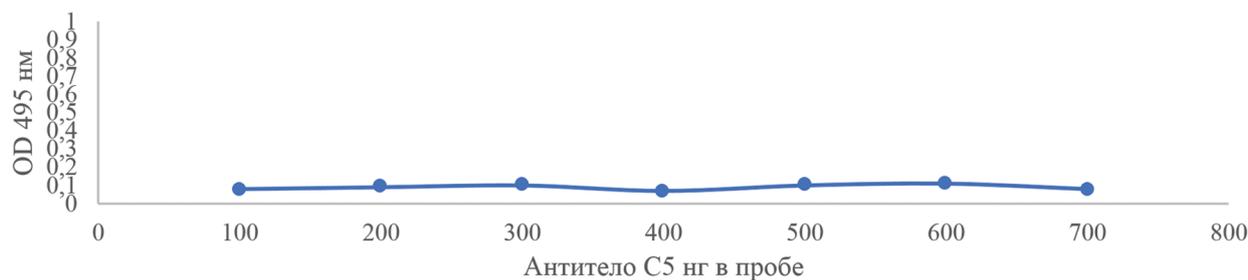


Рисунок 2 – Прямое связывание моноклональных антител C5 с иммобилизованным на полистироле апоферритином

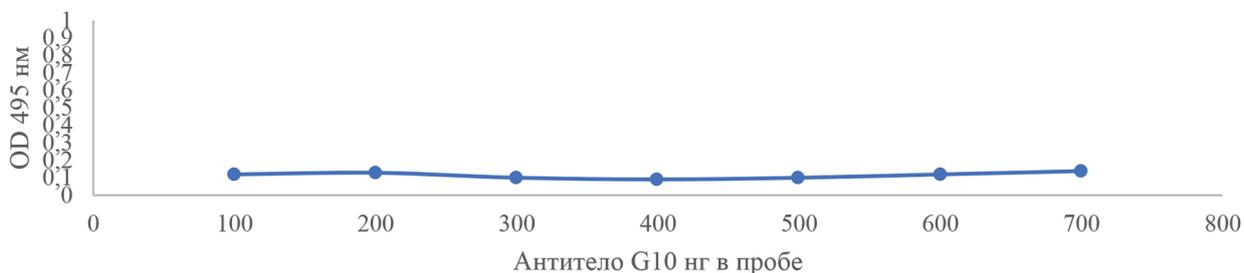


Рисунок 3 – Прямое связывание моноклональных антител G10 с иммобилизованным на полистироле апоферритином

При иммобилизации апоферритина на полистироле изменяется общая конформация молекулы белка и происходит изменение поверхностной эпитопной структуры.

В результате этих процессов эпитопы, с которыми могут взаимодействовать изучаемые моноклональные антитела, теряют свою конформацию и образование комплекса «антигенная детерминанта-антигенсвязывающий центр антитела» становится либо затруднительным, либо невозможным.

Для подтверждения этого предположения были проведены эксперименты, в которых моноклональные антитела взаимодействовали с апоферритином, находящимся в растворе. Был использован конкурентный анализ, в котором иммобилизованный на полистироле ферритин и растворимый апоферритин конкурировали за центры связывания на моноклональных антителах.

Экспериментальная система включала иммобилизованный на полистироле ферритин, 100 нм или 50 нм меченного биотином моноклонального антитела F11 или C5 или G10 и возрастающее количество апоферритина в растворе.

Проявление образовавшихся иммунных комплексов «антиген-антитело» на твердой фазе проводили с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой.

Аффинность связывания растворимого апоферритина мАТ G10 в 2,5 раза выше, чем у мАТ C5, но несколько ниже, чем у мАТ F11 (Рис. 4, 5, 6)

Анализируя полученные результаты конкурентного анализа взаимодействия панели моноклональных антител и растворимой формы апоферритина, можно предположить, что мАТ F11 направлено к наиболее иммунодоминантному кластеру эпитопов на растворимом апоферритине.

Кроме этого, совершенно очевидно, что кластеры эпитопов на апоферритине для всех трех моноклональных антител являются конформационными и структурно-лабильными, так как при иммобилизации апоферритина на полистироле структура эпитопов изменяется и связывание антител становится невозможным.

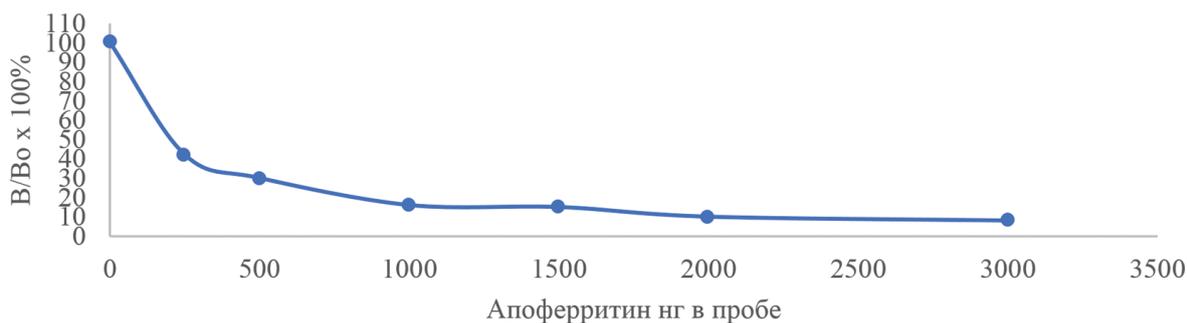


Рисунок 4 – Конкурентный анализ связывания растворимой формы апоферритина моноклональным антителом F11

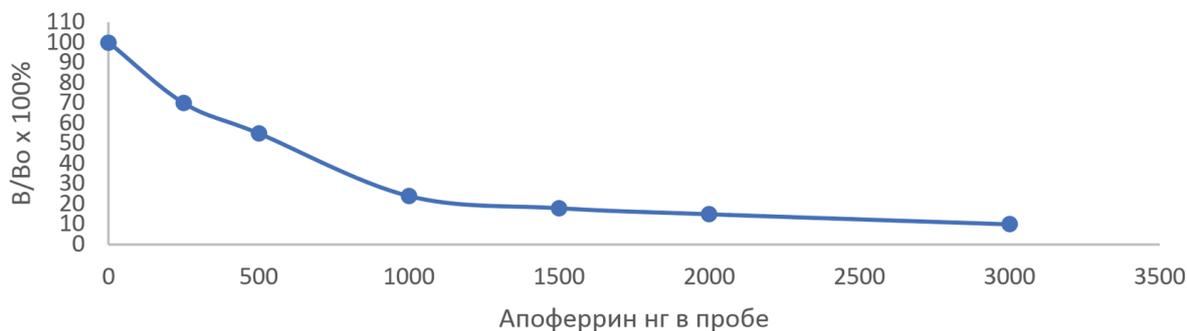


Рисунок 5 – Конкурентный анализ связывания растворимой формы апоферритина моноклональным антителом C5

Характеристика эпитопов моноклональных антител на белковых антигенах может помочь в разработке новых терапевтических средств, выявить маркеры специфических для рака эпитопов и определить защитные (и в некоторых случаях патогенные) эффекты вакцин.



Рисунок 6 – Конкурентный анализ связывания растворимой формы апоферритина моноклональным антителом G10

Кроме того, значительное увеличение числа охарактеризованных эпитопов на разных белковых антигенах, коррелирующих с их механизмами действия, может способствовать разработке более надежных алгоритмов и математических моделей для прогнозирования иммунодоминантных эпитопов на разных диагностически значимых белках.

Заключение. Любое изменение конформации белка приводит к нарушению существовавшей ранее поверхности его молекулы и, соответственно, к изменению ее функциональных свойств. Таким образом, изучение структуры и свойств поверхности белковых молекул и их изменений является одним из важнейших направлений исследования механизмов функционирования белков.

Иммобилизация апоферритина на полистирольной поверхности приводит к изменению эпитопной структуры данного белка и к устранению реактивных эпитопов связывания моноклональных антител F11, C5, G10. Растворимая форма апоферритина эффективно связывается с моноклональными антителами F11, C5, G10 в конкурентном анализе, что подтверждает конформационный характер кластеров детерминант на поверхности апоферритина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hiroyuki, W.* Ferritin for prevention of common viral infections / W. Hiroyuki, O. Hirotsugu, Y. Koji A. Fumiaki. // Journal of Infection and Chemotherapy. – 2014. – URL: <http://www.elsevier.com/locate/jic>.

2. Blankenhaus, B. et al. Ferritin regulates organismal energy balance and thermogenesis. / B. Blankenhaus, F. Braza, R. Martins, P. Bastos-Amador, I. González-García, A.R. Carlos, I. Mahu, P. Faisca, J.M. Nunes, P. Ventura, V. Hoerr, S. Weis, J. Guerra, S. Cardoso, A. Domingos, M. López, M.P. Soares // *Mol Metab.* 2019 Jun; 240: 64–79.

3. Marcos-Silva, L.; Narimatsu, Y.; Halim, A.; Campos, D.; Yang, Z.; Tarp, M. A.; Pereira, P. J.; Mandel, U.; Bennett, E. ; Vakhrushev, S. Y.; Levery, S. B.; David, L.; Clausen, H. Characterization of binding epitopes of CA125 monoclonal antibodies. *J. Proteome Res.* 2014, 13, 3349–3359.

СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГАММА- И РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ IN VIVO COMPARISON OF THE BIOLOGICAL EFFICIENCY OF GAMMA AND X-RAY RADIATION IN VIVO

**Н. Н. Веялкина¹, Е. П. Борботко^{2,3},
О. С. Аксёненко¹, В. В. Полевич^{2,3}, Е. А. Медведева¹**

N. Veyalkina¹, E. Borbotko^{2,3}, V. Aksionenka¹, V. Palevich^{2,3}, A. Miadzvedzveva¹

¹Государственное научное учреждение «Институт радиобиологии
Национальной академии наук Беларуси», г. Гомель, Республика Беларусь
veyalkina@mail.ru

²Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

³Учреждение образования «Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

¹Institute of Radiobiology of NAS of Belarus, Gomel, Belarus

²Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

³International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU,
Minsk, Republic of Belarus

В работе проведено сравнение биологических эффектов общего однократного гамма-(источник – ¹³⁷Cs) и рентгеновского облучения лабораторных мышей линий C57Bl/6 и Af. Оценивали ЛД_{50/30} и спонтанное образование опухолей в легких мышей в постлучевом периоде. Однократное общее облучение мышей выполняли на гамма-установке «ИГУР» и с помощью рентгеновского аппарата биологического назначения X-Rad 320. Значения показателя ЛД_{50/30} для обоих видов облучения были близки и составили 6,37 (6,04-6,71) Гр при гамма облучении на рентгеновской установке – 6,29 (6,01-6,67). Рентгеновское и гамма-облучение были эквивалентны по влиянию на 30-ти суточную выживаемость и уровень спонтанного образования опухолей в легких мышей линии Af в отдаленном постлучевом периоде.

The paper compares the biological effects of a single whole body irradiation by gamma (source – ¹³⁷Cs) and X-ray irradiation of laboratory mice of C57Bl/6 and Af lines. LD_{50/30} and spontaneous tumor formation in the lungs of mice in the post-radiation period were evaluated. A single irradiation of mice was performed using the IGUR gamma unit and X-Rad 320 X-ray apparatus for biological purposes. The values of the LD_{50/30} indicator for both types of irradiation were close and amounted to 6.37 (6.04-6.71) Gy for gamma irradiation and 6.29 (6.01-6.67)Gy for the X-ray unit. X-ray and gamma irradiation were equivalent in their effect on the of survival rate and on the level of spontaneous tumor formation in the lungs of Af mice in the late post-radiation period.

Ключевые слова: гамма-излучение, рентгеновское излучение, выживаемость, опухоли легкого, мыши.

Keyword: gamma radiation, X-rays, survival rate, lung tumors, mice.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-1-293-296>

Введение. Облучение – неотъемлемый инструмент, используемый в ходе радиобиологических, иммунологических, онкологических и др. исследований на лабораторных животных.

Еще с 60-х годов XIX века началось широкое применение гамма-облучателей, сначала для стерилизации медицинских изделий, а со временем и в самых различных областях: для облучения пищевых продуктов, обработки материалов, медицинского облучения и для научно-исследовательских целей при облучении клеток и лабораторных животных [1].

Благодаря научным исследованиям с использованием радиационного облучения был достигнут значительный прогресс в понимании биологических эффектов ионизирующего излучения и характеристике радиационных