

УДК 544.582.3:546.11.027*3+57.088.6+577.171.6

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ ДЕКСАМЕТАЗОНА ФОСФАТА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ АФФИННОСТИ ЛИГАНДОВ К РЕЦЕПТОРАМ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

© 2024 г. Г. А. Бадун^{а*}, Е. М. Жидкова^б, М. Г. Чернышева^а, А. Д. Еникеев^б,
М. Г. Якубовская^{б,в}, Е. А. Лесовая^{б,в,г}

^аХимический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

^бНациональный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России,
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

^вРоссийский университет дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

^гРязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
390026, Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

*e-mail: badunga@my.msu.ru

Получена 20.05.2024, после доработки 01.07.2024, принята к публикации 02.07.2024

Показана возможность введения трития с помощью метода термической активации в дексаметазон и дексаметазон фосфат. Меченые соединения были успешно использованы для оценки аффинности лигандов к рецепторам глюкокортикоидов.

Ключевые слова: тритий, радиолигандный метод, глюкокортикоиды, рецептор глюкокортикоидов, селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора

DOI: 10.31857/S0033831124040092

Меченные тритием биологически активные соединения широко используются в изучении биохимических процессов [1]. В последние годы разработано большое число методов введения трития в органические молекулы, включая как химический синтез, так и реакции изотопного обмена [2, 3]. Особое место среди этих методов занимает метод термической активации трития, который позволяет в одну стадию ввести радиоактивную метку в самые сложные соединения [4]. Так как вещество во время реакции специально охлаждается до низкой температуры, метод удобен для введения трития в макромолекулы, которые могут подвергаться структурным изменениям и деградировать при нагревании. Однако метод применим и для низкомолекулярных соединений, особенно если не требуется получения веществ с предельно высокой удельной активностью. Вместе с тем достижение высокой удельной активности с сохранением приемлемого выхода меченого соединения для веществ с невысокой молекулярной массой является важной задачей в расширении возможностей метода, например, для применения меченых соединений в радиолигандном анализе.

К таким веществам относятся глюкокортикоиды (ГК) — стероидные гормоны, более 50 лет назад введенные в клиническую практику для терапии

воспалительных, аутоиммунных, онкологических заболеваний. За это время было синтезировано, охарактеризовано и успешно применяется в терапии более 30 аналогов природных ГК стероидной структуры. Однако также ГК характеризует большое количество побочных эффектов, развивающееся у пациентов при длительном применении [5, 6]. Альтернативой ГК являются селективные глюкокортикоид-рецепторные агонисты (СГРА), зачастую нестероидной структуры. Общим в механизме действия СГРА и классических ГК является связывание с мишенью — глюкокортикоидным рецептором (ГР), хорошо известным транскрипционным фактором, реализующим эффекты ГК и их аналогов. Связывание лиганда с ГР приводит к активации рецептора в цитоплазме и запуску двух параллельных механизмов: 1) связыванию мономерного комплекса лиганд–рецептор с другими факторами транскрипции, приводящее к подавлению их активности (процесс транскрепрессии, играющий важную роль в реализации терапевтического действия ГК); 2) формированию гомодимера и связыванию димера с палиндромными последовательностями в промоторах и энхансерах провоспалительных, антиапоптотических и пропролиферативных генов (процесс трансактивации, опосредующий большую часть побочных эффектов

ГК) [7]. Отличие СГРА от классических ГК заключается в отсутствии формирования димера ГР при связывании с СГРА и, как следствие, отсутствие запуска трансактивации [8, 9].

Ниша лекарственных препаратов на основе СГРА достаточно широка, исследования ведут уже более 10 лет в области как соединений природного происхождения, так и их синтетических аналогов [10, 11]. В частности, хлорид 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-*N*-метилэтиламмония (Compound A или Cpda) – стабильный аналог гидроксифенилазиридина, выделенный из намибийского кустарника семейства померанцевых [7], используется в исследовательских целях для изучения роли трансрепрессии в реализации биологических эффектов ГК. Для данного соединения была описана аффинность к ГР, селективность в запуске трансрепрессии, а также широкий спектр терапевтически значимых биологических свойств [7]. Современные методические подходы к дизайну структур *in silico* и химическому синтезу позволяют получать большое количество новых молекул одновременно. Однако для доказательства механизма действия соединений необходим быстрый и дешевый метод оценки аффинности к ГР, позволяющий протестировать большое количество соединений, используя стандартизованные условия.

Активность лигандов ГР может быть оценена целым спектром косвенных методов: репортерный анализ с использованием генетически модифицированных клеточных линий [12–14], ПЦР-анализ ГР-зависимых генов [12, 14], конфокальная микроскопия [15, 16], оценка связывания по изменению поляризации флуоресценции в присутствии конкурентного лиганда [17–19]. Стоит отметить, что метод оценки по изменению поляризации как по литературным [20], так и по нашим собственным данным оказался нечувствителен к определению аффинности малых молекул. Прямые методы оценки аффинности включают в себя: поверхностный плазмонный резонанс (однако его использование не описано при оценке аффинности лигандов к ГР [21]), кристаллографию и аналитическое ультрацентрифугирование [22, 23],

радиолигандный метод [24]. Данные подходы отличаются более высокой точностью, однако кристаллография, поверхностный плазмонный резонанс являются дорогостоящими и требуют наличия сложной приборной базы, в то время как радиолигандный метод является классическим методом оценки аффинности лигандов к мишеням. Более того, необходимо отметить, что данный метод является стандартным методом, использующимся в доклинических исследованиях как специфической фармакологической активности *in vitro*, так и для оценки нецелевых (off-target) эффектов при изучении вторичной фармакодинамики [24].

Целью настоящего исследования являлось получение меченных тритием глюкокортикоидов дексаметазона и дексаметазона фосфата и сравнительный анализ аффинности немеченных лигандов глюкокортикоидного рецептора дексаметазона фосфата и Cpda с помощью полученных препаратов. На результат сравнительной оценки аффинности могут влиять: тип модели (клеточная или бесклеточная), концентрация ГР, концентрация радиоактивного лиганда, время инкубации, условия измерения. В задачи работы входило введение трития в ГК, а также подбор условий применения полученных соединений (времени инкубации и концентрации лиганда) для экспериментальной оценки аффинности лигандов к ГР в клеточной системе. Выбор рабочих концентраций лигандов соответствовал области малотоксичных значений и основывался на предварительном определении цитотоксичности соединений для модельной клеточной линии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора: дексаметазон (Macklin, Китай), дексаметазон фосфат динатриевая соль (Macklin, Китай), Cpda (Calbiochem, США). Структурные формулы соединений приведены на схеме 1.

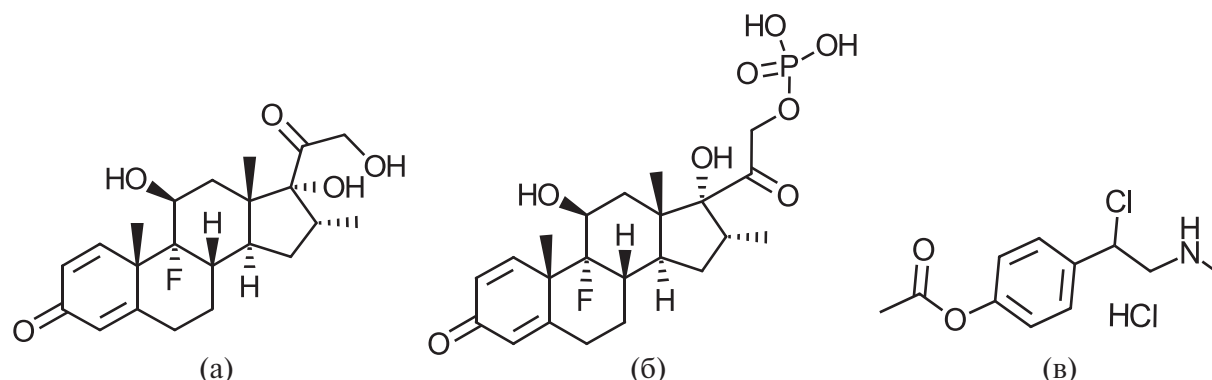


Схема 1. Лиганды глюкокортикоидного рецептора, использованные в работе: а – дексаметазон, б – дексаметазон фосфат, в – Compound A (Cpda).

На всех этапах работы радиоактивность меченых соединений измеряли на жидкостном сцинтилляционном спектрометре RackBeta 1215 (LKB, Финляндия), внося аликвоты растворов в сцинтилляционную жидкость Ultima Gold (PerkinElmer). При проведении радиолигандного анализа использовали также сцинтилляционную жидкость Hionic Fluor (PerkinElmer).

Для определения концентрации меченых соединений измеряли спектры поглощения на спектрофотометре Hitachi U-5100. Предварительно получали калибровочные зависимости оптического поглощения при 240 нм от концентрации дексаметазона в метаноле и дексаметазона фосфата в воде, которые были линейными в диапазоне от 2 до 20 мкг/л.

Получение меченных тритием препаратов

Для введения трития в дексаметазон и дексаметазон фосфат применили метод термической активации [4].

Для подготовки вещества к реакции с атомарным тритием получали тонкую пленку на стенках реакционного сосуда двумя способами:

- 1) равномерно распределяли раствор вещества (дексаметазон и дексаметазон фосфат) в метаноле на стенках реакционного сосуда с шероховатыми стенками и удаляли растворитель, используя слабый поток газа;

- 2) равномерно распределяли раствор вещества (только дексаметазон фосфат) в воде по стенкам реакционного сосуда с гладкими стенками, быстро замораживали сосуд жидким азотом и удаляли растворитель лиофилизацией.

Реакционный сосуд с нанесенной мишенью вещества присоединяли к установке для работы с газообразным тритием и удаляли воздух до остаточного давления 0.01 Па. Затем сосуд охлаждали жидким азотом до 77 К, заполняли газообразным тритием до давления 0.5 Па и активировали реакцию изотопного обмена нагреванием вольфрамовой проволоки электрическим током в течение 10 с. Температуру вольфрамовой проволоки варьировали от 1750 до 1980 К. После проведения реакции удаляли остаточный газ, сосуд размораживали под вакуумом и отсоединяли его от вакуумной установки. Меченое вещество смывали этанолом (дексаметазон) или водой (дексаметазон фосфат).

Раствор после выдержки (1 сут) упаривали до суха на ротаторном испарителе и снова растворяли в этаноле (дексаметазон) или воде (дексаметазон фосфат). Операцию повторяли 2 раза, что гарантировало удаление трития из лабильных положений меченых молекул.

Для анализа и чистки меченых препаратов от радиоактивных примесей использовали тонкослойную хроматографию и ВЭЖХ.

Для тонкослойной хроматографии использовали пластинки TLC Plates, Silica Gel on Aluminium, 20 X (Aldrich). Проводили анализ в следующих системах (соотношение компонентов по объему): А — бутанол—уксусная кислота—вода (3 : 1 : 1), R_f 0.73 (дексаметазон фосфат); Б — этанол—толуол—этилацетат (1:7:10), R_f 0.52 (дексаметазон), R_f 0.0 (дексаметазон фосфат); В — этанол—25%-ный водный аммиак (3:1), R_f 0.38 (дексаметазон фосфат), R_f 0.78 (дексаметазон).

Положение веществ на пластинке определяли с помощью УФ лампы (254 нм).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили с помощью оборудования Waters (Breeze): хроматографическая колонка Waters Nova-Pak C18 (150 × 3.9 мм), подвижная фаза 0.1% трифторуксусная кислота (А)—ацетонитрил (Б). Скорость потока 0.5 мл/мин, детектирование при 242 и 254 нм. Использовали следующие режимы проведения анализа: дексаметазон — линейный градиент от 30 до 80 % фазы Б за 25 мин, время выхода дексаметазона 14.8 мин, дексаметазона фосфата 8.5 мин; дексаметазон фосфат: изократический режим, соотношение фаз 74% (А)—26% (Б), время выхода дексаметазона фосфата 12.5 мин, дексаметазона 36.2 мин.

Только одна стадия очистки (ТСХ или ВЭЖХ) позволяла получать меченые препараты с радиохимической чистотой 92–95%. Для проведения экспериментов с клетками проводили очистку меченых препаратов в два этапа: сначала с помощью препаративной тонкослойной хроматографии, а затем с помощью ВЭЖХ. При двойной очистке радиохимическая чистота препаратов была более 99%.

Клеточные культуры

Клеточная линия хронического миелолейкоза K562 была получена из Биоресурсной коллекции клеточных линий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Клетки культивировали в стандартной среде RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамин, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) при 37°C в атмосфере 5%-ного CO₂.

Определение оптимальных условий регистрации

Клетки переносили в культуральную среду без сыворотки (2.5 млн клеток в 1 мл) для предотвращения неспецифической сорбции лигандов на белках сыворотки крови.

Для определения оптимального времени инкубации с исследуемыми препаратами клеткам вносили избыток [³H]дексаметазона (40 мкмоль/л) за 10, 30, 60, 90 и 120 мин до окончания эксперимента. Клетки инкубировали при 37°C. Затем клетки дважды отмывали центрифугированием в охлажденной культуральной среде без сыворотки (1500 об/мин, 5 мин). Клетки лизировали буфером RIPA (50 ммоль/л Трис

(рН 8.0), 150 ммоль/л NaCl, 1 ммоль/л этилендиаминтетрауксусная кислота, 0.1% додецилсульфат натрия, 0.5% дезоксихолат натрия, 1% тритон-X100, 10% глицерин, ингибитор протеиназ) 20 мин. Затем клеточный лизат переносили в сцинтилляционную жидкость и измеряли радиоактивность на ЖС-спектрометре RackBeta 1215 в течение 4 мин.

Для оценки оптимального количества тритиевой метки, при которой детектируется наиболее эффективное вытеснение метки исследуемыми лигандами, клетки инкубировали 90 мин при 37°C с [³H]дексаметазоном в различной концентрации (0.5, 1 и 2 мкмоль/л) с добавлением немеченого дексаметазона фосфата в концентрациях 10 и 50 мкмоль/л. В качестве контроля для каждого эксперимента использовали клетки, инкубированные только с [³H]дексаметазоном в концентрации 0.5, 1 и 2 мкмоль/л. Отмывку, лизис клеток и детекцию уровня радиоактивности проводили аналогично описанной выше методике.

Вытеснение меченого дексаметазона фосфата лигандами ГР

Клетки переносили в культуральную среду без сыворотки (2.5 млн клеток в мл) для предотвращения неспецифической сорбции лигандов на белках сыворотки крови. В культуральную среду вносили 200 мкл раствора [³H]дексаметазона (до концентрации 0.5 мкмоль/л) и 500 мкл немеченого дексаметазона фосфата или SpdA (концентрации 0.1–10 мкмоль/л в пробе). Клетки инкубировали 90 мин при 37°C. Отмывку, лизис клеток и детекцию уровня радиоактивности проводили аналогично описанной выше методике.

Результаты экспериментов представляли в виде процентов связывания меченого препарата с рецептором, принимая максимальный уровень сигнала (в точках без добавления конкурентного лиганда) за 100% (более низкий процент отражает наиболее сильное вытеснение метки исследуемым лигандом).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения исследований радиолигандным методом требуются меченые соединения с высокой удельной активностью. При использовании метода термической активации трития для получения меченых соединений необходимо учитывать, что реакция протекает в тонком поверхностном слое вещества, нанесенного на твердую подложку. В мягких условиях проведения реакции (сниженная температура атомизатора, малые временные экспозиции нагревания атомизатора) не происходит существенной деградации исходного и меченого вещества, что облегчает дальнейшую очистку и использование, однако степень замещения водорода на тритий будет при этом не предельно высокая. Важным фактором, влияющим на удельную активность меченого препарата,

является доступная поверхность мишени. Для ее увеличения используют реакционные сосуды с шероховатыми внутренними стенками. Эти обстоятельства учитывали при разработке методики введения трития в дексаметазон и дексаметазона фосфат.

На первом этапе рассмотрели возможность получения [³H]дексаметазона, который мало растворим в воде, и для получения мишени удобнее использовать раствор в метаноле, который наносили на шероховатые стенки реакционного сосуда. Изучение влияния температуры атомизатора на радиоактивность меченого соединения при массе мишени 0.22 мг показало, что с ростом температуры от 1820 до 1980 К происходило увеличение общей радиоактивности мишени от 5.8 до 8.4 мКи. Однако за счет возрастания вклада побочных реакций снижался выход [³H]дексаметазона, а его удельная радиоактивность уменьшалась от 1.5 до 0.7 Ки/ммоль.

Далее изучили, как влияет на удельную радиоактивность [³H]дексаметазона масса вещества, взятого для приготовления мишени. Как и ожидалось, уменьшение массы препарата, наносимого на стенки реакционного сосуда, увеличивало удельную радиоактивность меченого соединения (рис. 1). Однако рост удельной радиоактивности с уменьшением массы мишени был меньше, чем можно было ожидать для случая равномерного покрытия стенок сосуда веществом. Вероятно, это связано с тем, что при испарении метанольного раствора дексаметазон не образует равномерную пленку на стенках. Молекулы дексаметазона предпочтительно образуют агрегаты,

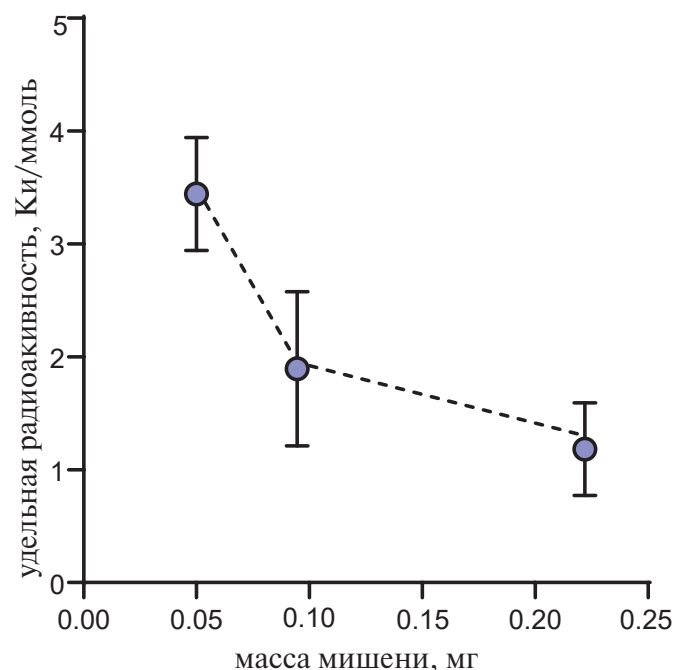


Рис. 1. Зависимость удельной радиоактивности [³H]дексаметазона от массы препарата, наносимого на стенки реакционного сосуда из метанольного раствора.

которые заполняют «ложбины» стенок шероховатого стекла, и в результате снижается доступность дексаметазона атомам трития. Аналогичный эффект наблюдали ранее при получении меченого тритием ванкомицина [25]. К тому же в экспериментах *in vitro* было показано, что у $[^3\text{H}]$ дексаметазона наблюдалась повышенная склонность к неспецифическому связыванию с клетками, а также наблюдалась адсорбция на стенках пробирок. Поэтому на следующем этапе работы использовали дексаметазон фосфат, хотя ранее на примере пантотеновой и фосфопантотеновой кислот было показано, что введение в состав молекулы фосфатной группы затрудняет изотопный обмен по связям C–H [26].

Дексаметазон фосфат хорошо растворим в воде, и мишень для введения трития готовили лиофилизацией водного раствора, нанесенного на гладкие стенки реакционного сосуда. Хотя в этом случае уже визуально наблюдалось неравномерное покрытие стенок веществом, однако доступность молекул дексаметазона фосфата атомам трития была выше, а вещество лучше смывалось со стенок после проведения реакции. Для мишени массой 40 мкг зависимость удельной радиоактивности $[^3\text{H}]$ дексаметазона фосфата от температуры атомизатора показана на рис. 2. При изменении температуры от 1900 до 1750 К удельная радиоактивность очищенного препарата увеличивалась от 7.7 до 11.6 Ки/ммоль. Такая удельная радиоактивность оказалась приемлемой для проведения экспериментов с клетками.

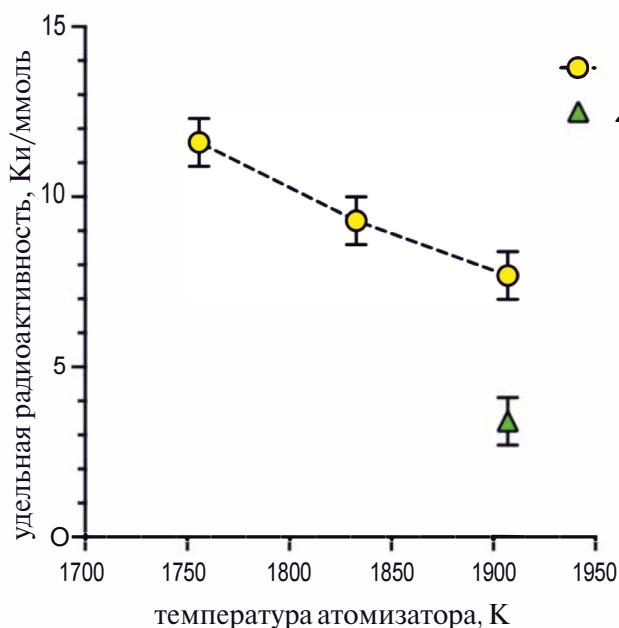


Рис. 2. Зависимость удельной радиоактивности $[^3\text{H}]$ дексаметазона фосфата от температуры атомизатора при нанесении вещества на гладкие стенки лиофилизацией водного раствора (1) и испарением метанольного раствора, нанесенного на шероховатые стенки реакционного сосуда (2).

Проведение предварительной валидации методики для выбора оптимальных условий проведения экспериментов является необходимым условием апробации метода. С учетом литературных данных о применении радиолигандного метода для определения аффинности соединений различной химической природы к ГР [27, 28] метод был оптимизирован в нескольких сериях экспериментов.

При проведении экспериментов по возможности использования полученного меченого препарата дексаметазона фосфата на первом этапе определили оптимальное время инкубации, обеспечивающее значимое увеличение уровня сигнала, а также концентрацию меченого соединения, позволяющую надежно выявить влияние немеченых лигандов на конкурентное связывание с рецептором.

С увеличением времени инкубации связывание возрастало, в интервале 60–90 мин наблюдался максимальный уровень, а затем происходило снижение примерно на 20% (рис. 3). На основании полученных данных выбрали 90 мин в качестве оптимального времени инкубации.

Для определения оптимальной концентрации меченого препарата провели инкубацию клеток с $[^3\text{H}]$ дексаметазоном в диапазоне концентраций 0.5–2.0 мкмоль/л без добавок и в присутствии 10 и 50 мкмоль/л немеченого дексаметазона фосфата. Было показано, что дексаметазон фосфат проявляет конкуренцию по отношению к меченому лиганду при всех исследуемых концентрациях (рис. 4). Также показано, что эффект вытеснения метки лигандом повышается с увеличением концентрации лиганда и снижением количества с $[^3\text{H}]$ дексаметазона. При этом наиболее сильный эффект ингибирования наблюдался при добавлении 0.5 мкмоль/л меченого дексаметазона (уровень сигнала падает до

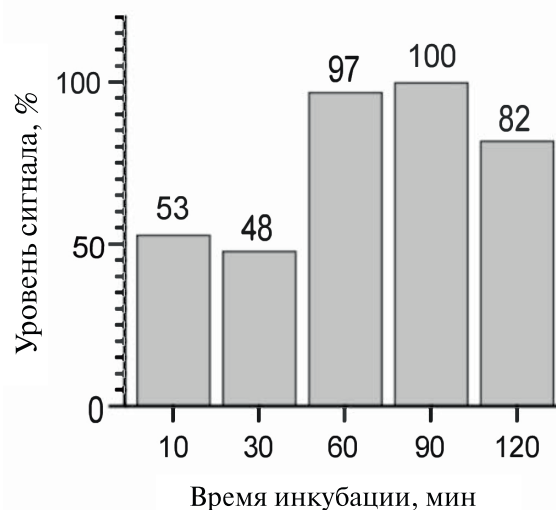


Рис. 3. Зависимость уровня сигнала (% от максимального) от времени инкубации с $[^3\text{H}]$ дексаметазоном.

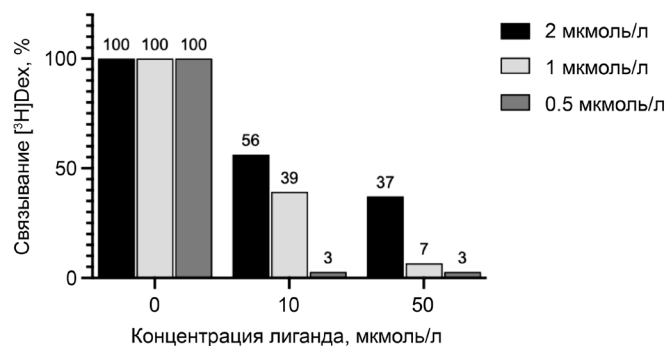


Рис. 4. Изменение доли связанного с ГР $[^3\text{H}]$ дексаметазона при его концентрации 0,5, 1 и 2 мкмоль/л и в присутствии немеченого дексаметазона фосфата. Время инкубации 90 мин.

3% при концентрации немеченого дексаметазона 10 и 50 мкмоль/л). При замене $[^3\text{H}]$ дексаметазона на $[^3\text{H}]$ дексаметазон фосфат наблюдалась аналогичная зависимость. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали $[^3\text{H}]$ дексаметазон фосфат при концентрации 0,5 мкмоль/л.

Таким образом, было показано, что при концентрации 0,5 мкМ $[^3\text{H}]$ дексаметазона в пробе полное ингибирование наблюдается на менее токсичных для выбранной клеточной модели концентрациях. Дальнейшую оценку динамики конкурентного ингибирования связывания $[^3\text{H}]$ дексаметазона с рецептором исследовали в диапазоне концентраций от 0 до 10 мкМ.

Для сравнительного анализа вытеснения $[^3\text{H}]$ дексаметазона фосфата двумя лигандами ГР — немеченым дексаметазоном фосфатом и нестероидным СГРА CpdA — клетки инкубировали с $[^3\text{H}]$ дексаметазоном фосфатом в присутствии широкого диапазона концентраций дексаметазона фосфата или CpdA. Результаты анализа конкурентного ингибирования связывания $[^3\text{H}]$ дексаметазона с ГР исследуемыми лигандами представлены на рис. 5. Оба лиганда (дексаметазон и CpdA) в концентрациях 1, 3 и 10 мкмоль/л ингибируют связывание $[^3\text{H}]$ дексаметазона с ГР в клеточной системе. Конкуренция обоих лигандов за сайты связывания в ГР носит дозозависимый характер. Сравнение конкурентных свойств дексаметазона фосфата и CpdA показало, что при всех исследованных концентрациях (1, 3 и 10 мкмоль/л) дексаметазон ингибирует связывание $[^3\text{H}]$ дексаметазона сильнее, чем CpdA.

Лигандные свойства CpdA в отношении ГР ранее были показаны в работах [27] и [28]. Мы также подтвердили факт связывания CpdA с ГР в клетках лейкозов. Полученные в нашей работе данные согласуются с тем, что CpdA обладает более низкой аффинностью к ГР, так как CpdA в активном центре рецептора образует 3 водородных связи в отличие от дексаметазона, имеющего сродство к 5 аминокислотным остаткам [28].

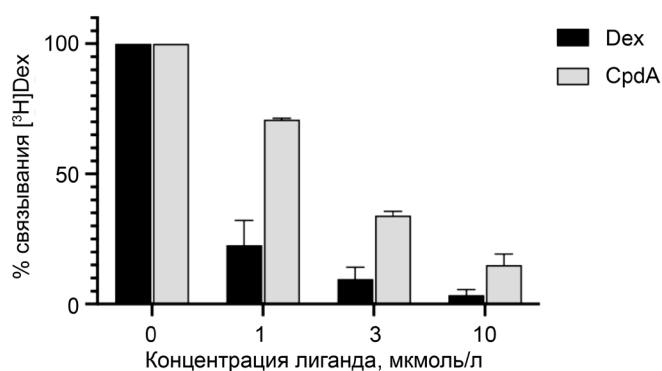


Рис. 5. Зависимость доли ГР-связанного $[^3\text{H}]$ дексаметазона фосфата (0,5 мкмоль/л) с ГР в присутствии немеченого дексаметазона фосфата или CpdA. Время инкубации 90 мин. Данные представлены в % от уровня сигнала в пробах с $[^3\text{H}]$ дексаметазоном.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В методе термической активации трития для получения максимальной радиоактивности меченого соединения критическим параметром при использовании небольших навесок вещества является равномерное покрытие стенок реакционного сосуда. В данной работе показано, что для дексаметазона, мишень которого получают испарением летучего растворителя, межмолекулярные взаимодействия предпочтительны по сравнению с взаимодействиями с материалом стенок сосуда, и при маленьких массах препарата покрытие становилось неравномерным. Увеличение площади стенок с помощью механической обработки абразивами не улучшало результат, так как агрегаты молекул дексаметазона заполняли углубления, что снижало их доступность атомам трития. В результате удельная активность $[^3\text{H}]$ дексаметазона не превысила 3,5 Ки/ммоль. Использование водорастворимого дексаметазона фосфата с подготовкой мишени лиофилизацией водного раствора в реакционном сосуде с гладкими стенками позволило получить $[^3\text{H}]$ дексаметазон фосфат с удельной активностью 11,6 Ки/ммоль, несмотря на снижение эффективности изотопного обмена по связям C—H за счет введения фосфатной группы.

Разработан метод определения относительной аффинности потенциальных лигандов к ГР по ингибированию связывания $[^3\text{H}]$ дексаметазона фосфата, который близок по точности и воспроизводимости к аналогичным методам, описанным в литературе [27, 28]. Кроме того, эксперименты, проведенные в клеточной системе, подтверждают, что полученный препарат $[^3\text{H}]$ дексаметазона фосфата пригоден для применения в радиолигандном методе определения аффинности к ГР не только стероидных аналогов природных ГК, но и малых молекул нестероидной структуры. Тритиевая метка в молекуле дексаметазона не изменяет его биологические свойства. Препарат проникает в клетки и связывается с рецептором,

а также дозозависимо вытесняется конкурентноспособными лигандами стероидной и нестероидной природы. Необходимо отметить, что полученные данные о разнице в силе конкурентного ингибирования связывания меченого дексаметазона фосфата в присутствии немеченого дексаметазона фосфата и CpdA демонстрируют меньшее сродство CpdA к рецептору, что согласуется с литературными данными и свидетельствуют о том, что разработанная нами клеточная система дает адекватные результаты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГК — глюкокортикоид

ГР — рецептор глюкокортикоидов

СГРА — селективные глюкокортикоид-рецепторные агонисты

CpdA — Compound A (хлорид (4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмония)

Dex — дексаметазон

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00321).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы утверждают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Atzrodt J., Derdau V., Kerr W.J., Reid M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018. Vol. 57. P. 1758–1784.
- Kopf S., Bourriquen F., Li W., Neumann H., Junge K., Beller M. // *Chem. Rev.* 2022. Vol. 122. P. 6634–6718.
- Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // *Радиохимия.* 2022. Т. 64. № 4. С. 303–349.
- Бадун Г.А., Чернышева М.Г. // *Радиохимия.* 2023. Т. 65. № 2. С. 158–171.
- Kadmiel M., Cidrowski J.A. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2013. Vol. 34. N 9. P. 518–530.
- Ramamoorthy S., Cidrowski J.A. // *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 2016. Vol. 42. N 1. P. 15–31.
- Lesovaya E., Yemelyanov A., Swart A.C., Swart P., Haegeman G., Budunova I. // *Oncotarget.* 2015. Vol. 6. N 31. P. 30730–30744.
- De Bosscher K., Haegeman G., Elewaut D. // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010. Vol. 10. N 4. P. 497–504.
- De Bosscher K., Beck I.M., Ratman D., Berghe W.V., Libert C. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2016. Vol. 37. N 1. P. 4–16.
- Lesovaya E.A., Chudakova D., Baida G., Zhidkova E.M., Kirsanov K.I., Yakubovskaya M.G., Budunova I.V. // *Oncotarget.* 2022. Vol. 13. P. 408–424.
- De Bosscher K. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010. Vol. 120. N 2–3. P. 96–104.
- Lesovaya E.A., Kirsanov K.I., Popa A., Belitsky G.A., Yakubovskaya M.G., Gordon L.I., Rosen S.T., Budunova I.V. // *Cell Cycle.* 2013. Vol. 12. N 1. P. 133–144.
- Edvinsson Å., Hoyer A., Hansson M., Kallak T.K., Sundström-Poromaa I., Skalkidou A., Lager S. // *Ups. J. Med. Sci.* 2020. Vol. 125. N 1. P. 30–36.
- Lesovaya E.A., Yemelyanov A.Yu., Kirsanov K.I., Yakubovskaya M.G., Budunova I.V. // *Biochem. Mosc.* 2011. Vol. 76. N 11. P. 1242–1252.
- Souffriau J., Eggermont M., Van Ryckeghe, S., Van Looveren K., Van Wyngene L., Van Hamme E., Vuylsteke M., Beyaert R., De Bosscher K., Libert C. // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. N 1. ID 12894.
- Nishi M., Ogawa H., Ito T., Matsuda K.-I., Kawata M. // *Mol. Endocrinol.* 2001. Vol. 15. N 7. P. 1077–1092.
- Chen T., Xie W., Agler M., Banks M. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2003. Vol. 1. N 6. P. 835–842.
- Seo J.H., Jin M.H., Chang Y.H. // *BMC Complement. Med. Ther.* 2020. Vol. 20. N 1. ID 176.
- Miner J.N., Tyree C., Hu J., Berger E., Marschke K., Nakane M., Coghlan M.J., Clemm D., Lane B., Rosen J. // *Mol. Endocrinol.* Vol. 17. N 1. P. 117–127.
- West D. C., Kocherginsky M., Tonsing-Carter E. Y., Dolcen D. N., Hosfield D. J., Lastra R. R., Sinnwell J.P., Thompson K.J., Bowie K.R., Harkless R.V., Skor M.N., Pierce C.F., Styke S.C., Kim C.R., de Wet L., Greene G.L., Boughey J.C., Goetz M.P., Kalari K.R., Wang L., Fleming G.F., Györfy B., Conzen, S. D. // *Clin. Cancer Res.* 2018. Vol. 24. N 14. P. 3433–3446.
- He X., Zhao W., Yao L., Sun P., Cheng G., Liu Y., Yu Y., Liu Y., Wang T., Zhang Q., Qin L., Zhang Q. // *Phytomedicine.* 2023. Vol. 119. ID 154953.
- Bain D.L., Yang Q., Connaghan K.D., Robblee J.P., Miura M.T., Degala G.D., Lambert J.R., Maluf N.K. // *J. Mol. Biol.* Vol. 2012. Vol. 422. N 1. P. 18–32.
- Bledsoe R.K., Montana V.G., Stanley T.B., Delves C.J., Apolito C.J., McKee D.D., Consler T.G., Parks D.J., Stewart E.L., Willson T.M., Lambert M.H., Moore J.T., Pearce K.H., Xu H.E. // *Cell.* 2002. Vol. 110. N 1. P. 93–105.
- Maguire J.J., Kuc R.E., Davenport A.P. // *Meth. Mol. Biol.* 2012. Vol. 897. P. 31–77.
- Шэнь Т., Чернышева М.Г., Бадун Г.А. // *Радиохимия.* 2023. Т. 65. № 6. С. 575–583.
- Бадун Г.А., Мясников И.Ю., Казаков А.Г., Федорова Н.В., Чернышева М.Г. // *Радиохимия.* 2019. Т. 61. № 2. С. 168–173.
- De Bosscher K., Berghe W.V., Beck I.M., Van Molle W., Hennuyer N., Hapgood J., Libert C., Staels B., Louw A., Haegeman G. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. Vol. 102. N 44. P. 15827–15832.
- Yemelyanov A., Czornog J., Gera L., Joshi S., Chatterton R.T., Budunova I. // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68. N 12. P. 4763–4773.

Preparation of Tritium Labeled Dexamethasone Phosphate and Its Application to Assess the Affinity of Ligands to Glucocorticoid Receptors

G. A. Badun^{a*}, E. M. Zhidkova^b, M. G. Chernysheva^a, A. D. Enikeev^b,
M. G. Yakubovskaya^{b,c}, and E. A. Lesovaya^{b,c,d}

^a*Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^b*Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia, 115478 Russia*

^c*Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia*

^d*Pavlov Ryazan State Medical University, Ministry of Health of Russia, Ryazan, 390026 Russia*

**e-mail: badunga@my.msu.ru*

Received May 20, 2024; revised July 1, 2024; accepted July 2, 2024

The possibility of introducing tritium using the thermal activation method into dexamethasone and dexamethasone phosphate has been shown. Labeled compounds have been successfully used to assess the affinity of ligands to glucocorticoid receptors.

Keywords: tritium, radioligand binding assay, glucocorticoid, glucocorticoid receptor, selective glucocorticoid receptor agonists