

АПТАМЕРЫ КАК СРЕДСТВО ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Семенчук А.В.

Научный руководитель – доцент, к. б. н. Замай Т.Н.

Сибирский федеральный университет

В настоящее время проблема успешного прогноза в лечении большинства заболеваний является наиболее актуальной. Диагностику необходимо осуществлять на стадии компенсаторно-приспособительных реакций, когда еще не начались необратимые изменения в организме. Для улучшения диагностики в последнее время стали широко применяться биомаркеры. Некоторые из них обладают высокой специфичностью и характерны только для одного вида заболеваний, другие могут обнаруживаться при различных патологиях. Благодаря прогрессу в области молекулярной биологии появились принципиально новые революционные подходы к диагностике и лечению. Новый подход в диагностике связан с применением технологии SELEX (системная эволюция лигандов экспоненциальным обогащением, **S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**Xponential **E**nrichment), позволяющей получать искусственные антитела, названные аптамерами, к любым биологическим мишеням.

Цель работы – выявление асцитных клеток карциномы Эрлиха в биологических жидкостях с помощью выбранных к ним аптамеров.

В качестве биологической мишени для создания аптамеров были выбраны клетки асцитной карциномы Эрлиха, изолированные на 9-ые сутки после их внутрибрюшинной трансплантации белым мышам ICR.

Трансплантация асцитной карциномы Эрлиха проводили следующим образом, Из брюшной полости мыши с асцитной карциномой Эрлиха на 9-ые сутки после трансплантации извлекали асцит и разводили его физиологическим раствором до концентрации 3-х млн. клеток в 200 мкл суспензии, которую использовали для инъекции мышам-реципиентам внутрибрюшинно. Каждой мыши вводили по 3 млн. асцитных клеток.

Для получения аптамеров использовали метод их селекции из случайных ДНК-библиотек методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX). В целом метод SELEX включал в себя повторение раундов двух альтернативных процессов: 1) селекции аптамеров, т.е. отделение ДНК, связавшейся с биологической мишенью, от свободной ДНК; 2) амплификации аптамеров с помощью ПЦР-реакции. Метод SELEX заключался в последовательной селекции, требующей, как минимум, 10 раундов отбора.

В 1-ом раунде осуществлялась инкубация библиотеки олигонуклеотидов с биологическими мишенями в течение 30 мин при 37°C (позитивная селекция). Затем клетки центрифугированием освобождались от несвязавшихся олигонуклеотидов. Связавшиеся олигонуклеотиды отделяли от биологической мишени с помощью денатурирования при 95°C с их последующим осаждением. Далее осуществляли инкубацию кандидатных аптамеров с клетками крови, тканей печени, почек и селезенки в течение 15 мин при 37°C (негативная селекция). После чего с несвязавшимися кандидатными аптамерами проводили симметричную и асимметричную полимеразную цепную реакцию. Такие раунды негативной и позитивной селекции повторяли 10 раз.

В результате получали аптамеры с флуоресцентной меткой Alexa-480.

Определение биологической активности полученных аптамеров определяли, оценивая долю апоптотических и некротических асцитных клеток.

Метод идентификации апоптотических и некротических клеток основан на разделении клеток в популяции на 3 группы, в зависимости от их окрашивания флуоресцентными красителями – Hoechst 33342 и Propidium iodide. Флуоресцентный голубой краситель Hoechst 33342 окрашивает конденсированный хроматин апоптотических клеток ярче, чем хроматин живых. Красный флуоресцентный краситель Propidium iodide окрашивает фрагментированную ДНК некротических клеток.

В некоторых образцах небольшая фракция клеток была со смешанным окрашиванием (апоптотическим ядром и Propidium iodide позитивные). Это связано с тем, что на поздних стадиях апоптоза возможно переключение программы гибели клеток с апоптотической на некротическую. В расчетах клетки с двойным окрашиванием относили к некрозу.

Для определения доли апоптотических и некротических клеток отмытые асцитные клетки инкубировали в растворе Хенкса содержащем Hoechst 33342 (1мг/мл) и Propidium iodide (1мг/мл) 10-15 мин при комнатной температуре. Затем на предметное стекло помещали каплю препарата, накрывали покровным стеклом и под масляной иммерсией (при увеличении 100) или без нее (увеличение 40) на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss AxioStar plus определяли количество живых, некротических и апоптотических клеток.

Количество апоптотических (голубых), некротических (красных и красно-голубых) и слабо светящихся живых клеток подсчитывали в режиме флуоресценции, общее количество клеток – в световом режиме на флуоресцентном микроскопе. Затем рассчитывали процентное соотношение всех трех фракций клеток по методу, описанному в работе (Izumov D.S. 2004).

Степень сродства аптамеров-кандидатов к клеткам–мишеням и ядрам-мишеням оценивали по интенсивности флуоресценции аптамеров, связанных с асцитными клетками и их ядрами после каждого раунда селекции с помощью спектрофлуориметра и люминесцентной микроскопии. Результаты исследований показали, что интенсивность флуоресценции аптамеров связанных с асцитными клетками достигала максимального значения к 10 раунду. Сродство аптамеров к ядрам асцитных клеток было максимальным на 9 раунд селекции. Оценка степени сродства асцитных клеток к аптамерам с помощью люминесцентной микроскопии показала аналогичные результаты. В контроле в отсутствие аптамеров флуоресценции асцитных клеток не наблюдалось. Аптамеры, полученные в 6-ом раунде селекции, имели малое сродство к асцитным клеткам, поэтому флуоресценция асцитных клеток, связанных с аптамерами 6-го раунда практически отсутствовала. Максимальная флуоресценция клеток наблюдалась при связывании их с аптамерами 10-го раунда селекции.

Исследование биологического эффекта аптамеров, полученных к асцитным клеткам, показал, что после инкубации асцитных клеток с аптамерами 10 раунда селекции хроматин был конденсирован у 25 % клеток, что свидетельствовало о начале апоптотического процесса, 20% клеток находилось в состоянии некроза.

Таким образом, в результате работы были получены искусственные антитела к асцитным клеткам карциномы Эрлиха, обладающие противоопухолевым эффектом, специфичность связывания которых была максимальна на 10 раунд селекции.