

## **ДИАГНОСТИКА РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ АПТАМЕРОВ**

**Замай Г.С.**

**научный руководитель д-р мед. наук, проф. Салмина А.Б.  
Красноярский государственный медицинский университет  
им. проф. Войно-Ясенецкого**

Опухолевые заболевания широко распространены и являются второй после сердечно-сосудистых заболеваний причиной смерти от болезней.

Среди всех видов онкозаболеваний, рак легкого является наиболее распространенной формой злокачественных новообразований [2], он затрагивает более миллиона людей по всему миру и составляет около 25 % всех смертей от рака [1,5].

В России каждый год вновь регистрируется свыше 63 тыс. заболевших раком легкого [2], а основная масса больных выявляется в IV стадии, когда исход лечения уже не является благоприятным [4]. Высокая смертность, в основном, связана не с трудностью терапии, а с отсутствием эффективных подходов для выявления опухоли на ранних стадиях развития [2]. Поэтому для обеспечения эффективного лечения и увеличения выживаемости пациентов необходима ранняя и своевременная диагностика рака легкого.

В настоящее время для диагностики онкологических заболеваний применяются методы, позволяющие регистрировать морфологические, биохимические и иммунологические изменения в тканях, однако чувствительность и специфичность большинства этих методов недостаточно высока. Суммарная 5-летняя выживаемость составляет 6% для МРЛ и 5-10% для НМРЛ [2]. Таким образом, разработка новых методов диагностики рака легкого человека, которые позволят выявить опухоль на ранних стадиях развития является актуальной.

В настоящее время благодаря прогрессу в области молекулярной биологии появились принципиально новые подходы в диагностике и лечении. Это связано с разработкой технологии SELEX [9], позволяющей осуществлять направленный отбор олигонуклеотидов (аптамеров), обладающих способностью связываться с разнообразными биологическими мишенями и, таким образом, выполнять роль искусственных антител [10-14].

Аптамеры – синтетические одонитевые молекулы РНК или ДНК (размером 30-80 нуклеотидов), способные к специфичному связыванию с любыми молекулами-мишенями (белками, пептидами, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, малыми органическими молекулами, вирусными частицами, целыми клетками и даже тканями) [15].

Благодаря пиколярному уровню чувствительности аптамеров [16] можно определять наличие продуктов распада опухоли и циркулирующих раковых клеток в крови даже на ранних стадиях развития заболевания, вследствие чего аптамеры могут стать основой для разработки метода диагностики онкологических заболеваний.

Новизна работы состоит в разработке нового метода диагностики рака легкого, основанного на выявлении в крови циркулирующих опухолевых клеток и белков опухолевой ткани с помощью аптамеров.

Цель проекта – разработка метода диагностики рака легкого человека на основе аптамеров, меченых флуоресцентной меткой.

Задачи:

1. Выбрать аптамеры к опухолевой ткани легкого человека с использованием технологии SELEX
2. Клонировать аптамеры, секвенировать их последовательности и выбрать

наиболее специфичные клоны аптамеров

3. Осуществить набор образцов крови здоровых людей; больных раком легкого человека на разных стадиях развития и другими видами онкологических заболеваний

4. Выяснить возможность использования аптамеров к опухолевой ткани легкого человека для диагностических целей

Подбор аптамеров к опухолевой ткани легкого человека осуществляли с использованием технологии SELEX путем чередования позитивной и негативной селекции.

Для выбора аптамеров использовали опухолевую ткань легкого человека и прилежащую к ней здоровую ткань, полученные в результате ее оперативного удаления у онкобольных. В качестве негативных мишеней служили интактная кровь здорового человека и здоровая ткань легкого человека. Всего было сделано 13 раундов селекции аптамеров, в результате которых были получены аптамеры с флуоресцентной меткой Alexa-488.

Наличие одноцепочечной ДНК в ПЦР-продукте отслеживали с помощью агарозного гель-электрофореза. Электрофорограмма показала, что в каждом раунде селекции аптамеров получался чистый ПЦР-продукт без примесей.

Специфичность связывания аптамеров с опухолевой тканью легкого человека проверяли с помощью проточной цитометрии. Флуоресценцию исследуемых аптамеров, связавшихся с мишенью, определяли на проточном цитометре. Результаты проточной цитометрии показали, что наибольшей специфичностью к опухолевой ткани легкого человека обладают аптамеры 10 раунда селекции.

Кроме того, специфичность связывания аптамеров с опухолевой тканью легкого человека оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии.

При инкубации аптамеров со своей мишенью (опухолевой тканью легкого) появлялась флуоресценция, свидетельствующая о связывании опухолевой ткани легкого с аптамерами, имеющими флуоресцентную метку Alexa-488.

При инкубации аптамеров со здоровой тканью флуоресценции не обнаруживалось.

Для разделения полученного пула аптамеров на отдельные виды осуществляли процесс клонирования, в результате которого получали клоны аптамеров, подходящие для секвенирования. В качестве компетентных клеток использовали E.coli, которые высевали на чашки Петри с теплой питательной средой. Искомую ДНК выделяли.

Далее аптамеры секвенировали, в результате чего получили полные сиквенсы клонов аптамеров. На основе полученных нуклеотидных последовательностей аптамеры были искусственно синтезированы.

Для изучения возможности полученных аптамеров выявлять в крови белки, специфичные для опухолевой ткани легкого, сыворотку крови онкобольных инкубировали с аптамерами, мечеными флуоресцентной меткой Alexa-488; аптамерами, связанными с биотином, и магнитными частицами, связанными со стрептавидином в течение 20 минут. В результате инкубации формировался комплекс из белков, специфичных для опухолевой ткани легких; аптамеров, меченых Alexa-488, и биотинилированных аптамеров, связанных со стрептавидиновыми магнитными частицами. Полученные комплексы концентрировали с помощью магнита на стенке пробирки, трижды отмывали от несвязавшихся аптамеров.

Белки, выделенные из сыворотки крови онкобольных с помощью аптамеров и магнитных частиц, флуоресцировали в зеленом диапазоне (рис.1).

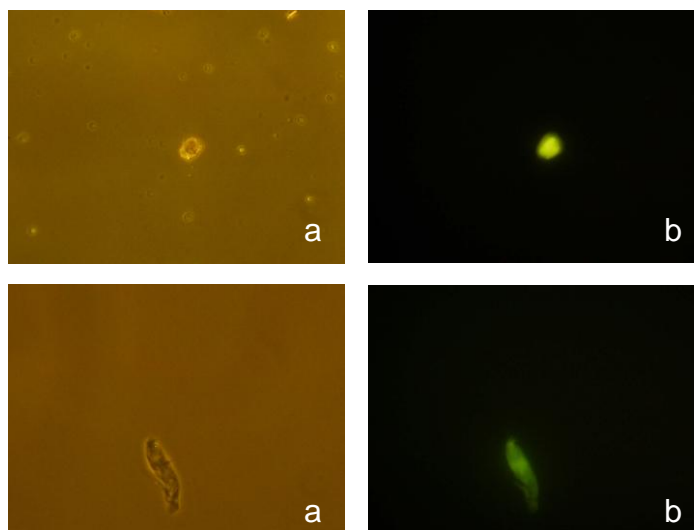


Рисунок 1. – Микроскопия сыворотки крови больных раком легкого: а – световая микроскопия, б – флуоресцентная микроскопия.

Аналогично проведенные процедуры с кровью здоровых людей не выявляли флуоресцирующих белков в сыворотке.

Кроме того, с помощью аптамеров, было обнаружено наличие циркулирующих опухолевых клеток и клеточных кластеров в крови больного. Для этого в цельную кровь больного, забравшуюся с антикоагулянтом добавляли лизирующий раствор. После процедуры гемолиза эритроцитов к исследуемому образцу крови добавляли меченые красной флуоресцентной меткой аптамеры и меченые зеленой флуоресцентной меткой антитела к цитокератину. Исследуемый образец изучали с помощью флуоресцентного микроскопа (рис.2).

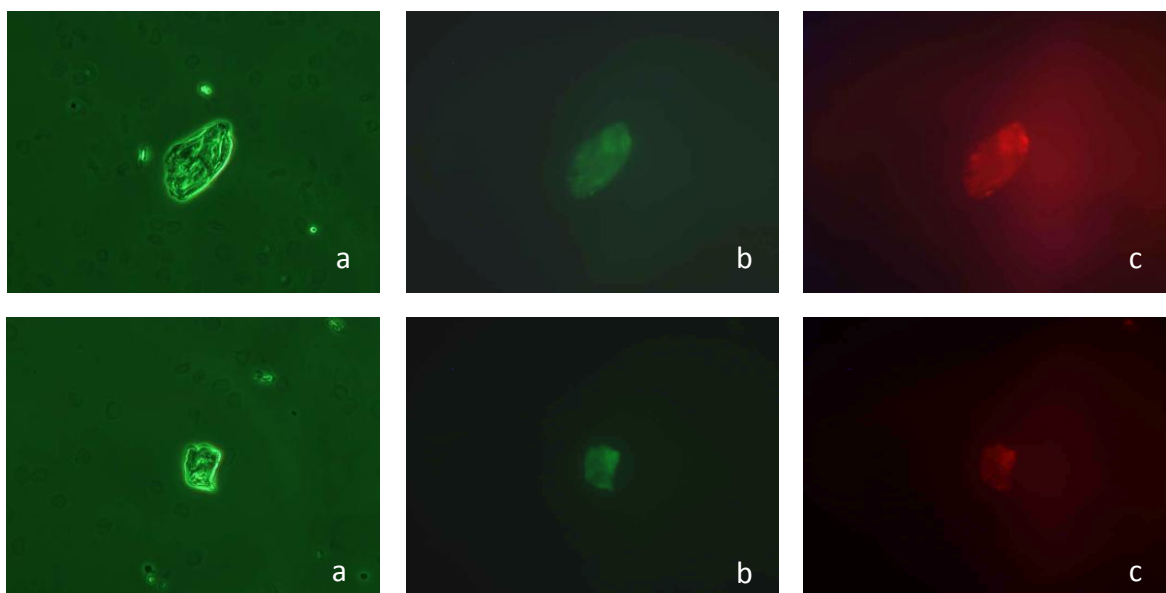


Рисунок 2 – Микроскопия крови больного раком легкого. Циркулирующие опухолевые клетки мечены антителами к цитокератинам и аптамерам, а – световая микроскопия, б, с – флуоресцентная микроскопия опухолевых клеток; б – флуоресценция цитокератина, с – флуоресценция меченых аптамеров.

Для контроля использовали кровь здоровых людей и больных воспалением легких. В крови здоровых людей и больных пневмонией циркулирующих опухолевых клеток не обнаружено.

На данный момент осуществляется отбор наиболее специфично связывающихся с тканями рака легкого клонов аптамеров, которые будут использованы в дальнейшей работе.

Для завершения исследования будет осуществлен забор образцов крови, на которых будет проводиться анализ специфичности связывания аптамеров. На основе полученных результатов планируется разработать метод диагностики рака легкого человека по крови с помощью аптамеров.

Предлагаемый метод можно будет применять в больницах для диагностики РЛ по направлению специалиста, а также для скрининга населения.

1. Пономарева, А. А.. Молекулярно-генетические маркеры в диагностике рака легкого. / А. А. Пономарева, Е. Ю. Рыкова, Н. В. Чердынцева, Е. Л. Чойнзонов, П. П. Лактионов, В. В. Власов // Молекулярная биология – 2011. – Т. 45. – № 2. – С. 203-217;
2. Sunil K. Arya. Lung Cancer and Its Early Detection Using Biomarker-Based Biosensors. / Sunil K. Arya, Shekhar Bhansali // Chem. Rev. – 2011 – V. 111 – P. 6783-6809
3. Parkin, D.M.. Global Cancer Statistics. / D.M. Parkin, B. Freddie, J.Ferlay, P. Pisani // CA Cancer J. Clin. – 2005 – V. 55 – P.74-108.
4. Mazzone, P. J. / P. J. Mazzone, J. Hammel, R. Na Dweik, C. Czich, D.Laskowski, Mekhail, T. Thorax // 2007 – V.62 – P. 565.
5. Sung, H. J. / H. J. Sung, J. Y. Cho // BMB Rep. – 2008 – V.41 – P.615.
6. Ellington, A.D. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands / A.D. Ellington, J.W.Szostak // Nature. –1990. –№ 346. – P. 818-822.
7. Robertson, D. L / D. L.Robertson, G. F. Joyce, // Nature. – 1990 – №. – P. 344, 467.
8. Tuerk, C / C. Tuerk, L. Gold // Science. –1990 – №249 – P. 505.
9. Wilson, D. S. / D. S.Wilson, J. W. Szostak // Annu. ReV. Biochem. – 1999. – № 68. – P. 611.
10. Gold, L. / L. Gold, Polisky, B. Uhlenbeck, O. Yarus // Annu. ReV. Biochem. – 1995. – №64. – 763.
11. Juewen Liu. Functional Nucleic Acid Sensors / Juewen Liu, Zehui Cao, Yi Lu // Chemical Reviews – 2009 – V. 109. – №5. – P.1949
12. Кульбачинский, А.В. Методы отбора к белковым мишеням / А.В. Кульбачинский // Успехи биол. химии. – 2006. – №46. – С.193-224.
13. Subash C.B . An RNA Aptamer That Discriminates Bovine Factor IX from Human Factor IX / Subash C.B. Gopinath, Dhakshnamoorthy Balasundaresan, Joe Akitomi, Hiroshi Mizuno // Nucleic Acids Res. – 2008. –V.36. – №21. – P. 6739-6751