

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
Е. И. Шишацкая  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Разработка препарата для интраоперационного окрашивания глиобластомы и  
оценка его токсичности

Руководитель  
Доцент, канд. бiol. наук \_\_\_\_\_

Н. М. Титова

Консультант  
Профessor, д-р бiol. наук \_\_\_\_\_

Т. Н. Замай

Выпускник \_\_\_\_\_

А. А. Кошманова

Красноярск 2020

## **РЕФЕРАТ**

Выпускная квалификационная работа по теме «Разработка препарата для интраоперационного окрашивания глиобластомы и оценка его токсичности» содержит 44 страниц текстового документа, 13 иллюстраций и 40 источников литературы.

**КОНЬЮГАТЫ АПТАМЕРОВ С КВАНТОВЫМИ ТОЧКАМИ, ИНТРАОПЕРАЦИОННОЕ ОКРАШИВАНИЕ, ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫМИ АПТАМЕРАМИ, ТОКСИЧНОСТЬ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК, ГЛИОБЛАСТОМА.**

Объект – препарат коньюгатов квантовых точек с аптамерами для визуализации опухолевых клеток послеоперационного макропрепарата глиобластомы.

Цель – разработка метода интраоперационного окрашивания глиобластомы с использованием аптамеров, коньюгированных с квантовыми точками (QD), оценив их токсичность *in vivo*.

Задачи:

1. Поиск наиболее оптимальных методов коньюгации квантовых точек с аптамерами.

2. Визуализация способности коньюгатов квантовых точек с аптамерами выявлять опухолевые клетки в ткани глиобластомы.

3. Визуальная оценка токсичности коньюгатов квантовых точек с аптамерами *in vivo*.

Результаты проведённого исследования демонстрируют, что способность разработанного препарата коньюгатов квантовых точек с аптамерами визуализировать опухолевые клетки в ткани глиобластомы подтвердилась. Токсичность препарата *in vivo* не была выявлена, поэтому он имеет потенциал быть использованным для пациентов при интраоперационном окрашивании злокачественных очагов глиальной опухоли головного мозга.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Глиобластома .....	6
1.1.1 Барьеры при лечении глиобластомы .....	7
1.1.2 Стандартная диагностика и терапия глиобластомы .....	8
1.2 Активные формы кислорода .....	9
1.2.1 Повреждение молекул АФК .....	11
1.2.2 Роль АФК в патогенезе глиом.....	11
1.2.3 Применение химиотерапии и определение АФК .....	12
1.3 Аптамеры, как перспектива в лечении онкопатологий .....	13
1.3.1 Метод SELEX для отбора аптамеров.....	14
1.3.2 Преимущества аптамеров перед антителами .....	15
1.3.3 Преимущества аптамеров в диагностическом применении ..	15
1.4 Квантовые точки .....	16
1.4.1 Функционализация поверхности и оформление КТ .....	18
1.4.2 Квантовые точки на основе кадмия (Cd). Исследование токсичности .....	19
2 Материалы и методы.....	22
2.1 Материалы и реагенты: .....	22
2.2 Метод конъюгации квантовых точек с праймерами.....	23
2.3 Первичная оценка связывания препарата с послеоперационным материалом ткани глиобластомы .....	24
2.4 Определение острой токсичности спрея <i>in vivo</i> в эксперименте с мышами.....	26
2.5 Выявление АФК флуоресцентным зондом с помощью микроскопии .....	28
3 Результаты исследования и обсуждения.....	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	33

## ВВЕДЕНИЕ

Глиальные опухоли головного мозга продолжают оставаться актуальной проблемой здравоохранения. Мультиформная глиобластома (ГБМ) является наиболее распространённой глиальной опухолью и самой летальной формой рака головного мозга. Быстрое прогрессирование и анатомическое расположение опухолевого очага ограничивают эффективность терапевтических вмешательств. Это подчёркивает необходимость обнаружения новых способов, инструментов её терапии и резекции.

Ткань, окружающая опухоль, может быть визуально идентична здоровой ткани, однако она трансформируется и содержит злокачественные клетки, которые за короткое время могут стать точкой роста новой опухоли.

Аптамеры, специфичные для опухолевых клеток и связанные с флуоресцентными красителями, которые можно обнаружить с помощью стандартных хирургических микроскопов, могут помочь решить проблему полной резекции злокачественных очагов в пораженном мозге.

Цель работы: разработать метод интраоперационного окрашивания глиобластомы с использованием аптамеров, конъюгированных с квантовыми точками (QD), оценив их токсичность *in vivo*.

Задачи:

1. Поиск наиболее оптимальных методов конъюгации квантовых точек с аптамерами.
2. Визуализация способности конъюгатов квантовых точек с аптамерами выявлять опухолевые клетки в ткани глиобластомы.
3. Визуальная оценка токсичности конъюгатов квантовых точек с аптамерами *in vivo*.

Работа выполнена в Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

# **1 Обзор литературы**

## **1.1 Глиобластома**

Глиобластома или глиобластома мультиформная (ГБМ) является высоко злокачественной формой глиомы, связанной с неопластическими глиальными клетками в головном мозге, включая олигодендроциты, астроциты и эпендимные клетки [1]. По данным ВОЗ ГБМ классифицируется как опухоль головного мозга IV степени, что является наиболее агрессивным изменением злокачественных новообразований ЦНС. ГБМ также является одной из наиболее распространенных опухолей головного мозга, частота заболеваемости ею около 3 на 100 000 человек в год [2, 3].

Это заболевание имеет сложную генетическую экспрессию, в том числе перестройку некоторых хромосом, амплификацию рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), мутацию гена белка-гомолога фосфатазы и тензина (PTEN), гена нейрофибромина 1 (NF1), мутацию опухолевого супрессора p53, белка ретинобластомы (RB1), тромбоцитарного рецептора фактора роста (PDGFRA1), изоцитратдегидрогеназы (IDH1 / 2) и делецию CDKN2A/B (ген-супрессор опухолевого роста, ответственный за развитие меланомы) [1, 4].

Молекулярные исследования глиобластом показали, что в большинстве опухолей наблюдаются рецидивирующие молекулярные изменения, нарушающие основные пути, участвующие в регуляции роста (рецепторная тирозинкиназа (RTK), митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) и фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) сигнальные пути), в клеточном цикле, в репарации и апоптозе ДНК (p53), а также контролирующие состояние хроматина и длины теломер [5, 6].

ГБМ обладает рядом уникальных свойств, связанных с плохим прогнозом: (1) большое количество злокачественных клеток, которые находятся в состоянии покоя и могут быстро развиваться против

противоопухолевых препаратов (химиорезистентность); (2) глиома имеет инфильтративный рост на расстоянии 1-2 см от исходной опухоли, что создает нечеткие границы между злокачественной и здоровой тканью, поэтому чрезвычайно сложно полностью отразить опухолевую ткань во время операции [6]; (3) хирургическая процедура может стимулировать рост злокачественных клеток; (4) барьер опухоли головного мозга предотвращает большинство химиотерапий или других противораковых процедур для достижения опухолевой ткани, что приводит к плохой цитотоксической активности и химиорезистентности [1, 7]. По всем этим причинам период жизни у большинства пациентов с ГБМ составляет приблизительно 1 год, и только 5% пациентов выживают дольше 5 лет [2, 4].

### ***1.1.1 Барьеры при лечении глиобластомы***

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой основное препятствие для системного лечения опухолей головного мозга и других расстройств ЦНС [1, 4, 8]. ГЭБ состоит из эндотелиальных клеток, которые включают капилляры головного и спинного мозга и различные типы периваскулярных клеток, таких как перициты, астроциты, микроглиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры [1]. Эндотелиальные клетки ГЭБ имеют плотные соединения, которые образуют непрерывный и почти непроницаемый барьер, что приводит к ограниченному парациеллюлярному переносу малых и липид-растворимых молекул и более высокому содержанию митохондрий, необходимых для транспорта в и из мозга [1]. Фактически, ГЭБ позволяет свободно проходить только воде, ионам и небольшому количеству липофильных молекул  $< 500$  Да [4, 7]. Около 98% малых молекул и 100% крупных молекул не могут проникать через этот барьер.

Опухоли головного мозга могут влиять на целостность ГЭБ, но это не означает, что количество поступающего лекарственного средства возрастёт.

Более того, инвазивный характер глиом может приводить к распространению злокачественных клеток вне разрушенной области ГЭБ [1, 9, 10]. Гематоэнцефалический опухолевый барьер (ГЭОБ или ВВТВ) – плотная сеть опухолевых сосудов в тканях головного мозга, она также создаёт препятствие для противораковых препаратов. Большое количество переносчиков оттока на поверхности эндотелиальных клеток опухолевых тканей может выкачивать лекарство из клеток, тем самым увеличивая резистентность к химиотерапии ГБМ [1, 7]. Из-за всех описанных факторов в мозге недостаточно воздействия на лекарственные средства, и поэтому лечение ГБМ и других типов внутричерепных опухолей остается большой проблемой.

### ***1.1.2 Стандартная диагностика и терапия глиобластомы***

Начальным диагностическим подходом для пациентов с подозрением на мультиформную глиобластому (ГБМ) является магнитно-резонансная томография (МРТ), которая позволяет определить размер, форму и расположение опухоли [2]. Также для определения наличия опухоли может быть использована компьютерная томография (КТ), однако она редка из-за относительного более низкого разрешения по сравнению с МРТ [2, 9].

Для максимизации визуализации опухоли были включены флуоресцентные маркеры (AuNPs, MNPs, QDs и др.), которые либо метаболизируются опухолевыми клетками, либо накапливаются в зонах разрушения ГЭБ [2, 8].

С точки зрения биомаркеров для диагностики и мониторинга ГБМ, подтверждено наличие прогностической ценности мутации гена изоцитратдегидрогеназы (IDH) [1, 9]. На основе его мутации ВОЗ в 2016 году глиобластомы были сгруппированы в три категории: 1) первичные или возникшие *de novo* (IDH-wild type); 2) вторичные (IDH-mutant), возникшие из

глиом более низкой степени злокачественности; 3) ГБМ другой специфичности (NOS), когда оценка IDH затруднена [4].

Новая классификация ВОЗ 2016 года подчеркивает актуальность таких диагностических молекулярных маркеров, как мутации гена IDH1 / IDH2 (2q34 / 15q26.1); мутация гена белка ремоделирования хроматина ATRX, связанные с X-сцепленными синдромами (q21.1); делеции в 1p / 19q и мутация промотора обратной транскриптазы теломеразы TERT (5p15.33) [3, 10].

Несмотря на вышеперечисленное, ни один из существующих стандартов диагностики не обеспечивает динамическую информацию в реальном времени о прогрессировании опухоли и терапевтической эффективности, что было бы чрезвычайно важно для мониторинга быстрого прогрессирования злокачественных опухолей, таких как ГБМ [2, 8].

Стандарт терапии против ГБМ включает в себя хирургическую резекцию, последующую лучевую терапию и химиотерапию [1, 8]. Хирургическое удаление облегчает симптомы пациента, однако низкая выживаемость, короткие сроки жизни после таких процедур и рецидивы подчеркивают необходимость выявления более эффективных терапевтических инструментов.

## **1.2 Активные формы кислорода**

Активные формы кислорода (АФК или ROS) - реакционноспособные вещества, образующиеся из молекулярного кислорода при его частичном восстановлении [11]. Присоединение электронов делает кислород неустойчивой молекулой, создавая свободные радикалы в этом процессе.

Активные формы кислорода объединяют целый ряд образующихся в организме промежуточных продуктов метаболизма кислорода, таких как синглетный кислород ( ${}^1\text{O}_2$ ), супeroxидный ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), гидроксильный ( $\cdot\text{OH}$ )

радикалы, пероксинитрит-ион ( $\text{ONOO}^-$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и другие [11, 12].

Активные формы кислорода разделяют на две группы: первичные и вторичные [12]. Первичные АФК образуются непосредственно в ферментативных реакциях, протекающих в клетках. К ним относятся  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{CO}$ . Вторичные АФК образуются в результате взаимодействия АФК между собой или другими молекулами. В эту группу входят  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}_2^\bullet$  и др. Первичные АФК выполняют, прежде всего, регуляторные функции, участвуя в процессах внутриклеточной и внеклеточной сигнализации. Вторичные АФК вызывают повреждение биомолекул и могут быть ответственны за развитие многих заболеваний [11, 13].

В результате функционирования систем генерации АФК и антиоксидантной защиты, мембранных систем транспорта различных типов окислителей и восстановителей, в клетке устанавливается определенное редокс-состояние [11]. При несоответствии между этими системами из-за увеличения количества окисленных молекул и уменьшения их удаления возникает окислительный стресс.

Развитие окислительного стресса происходит при нарушении окислительно-восстановительных процессов в клетках, в частности, при опухолегенезе [2, 13]. Повышенное внутреннее содержание АФК стимулирует онкогены, ускоряет метаболизм и приводит к аномалиям митохондрий [13]. Более того, опухолевые клетки посредством образования свободных радикалов и особенно пероксида водорода могут приводить к повреждению здоровых клеток и тканей, способствуя росту опухоли и инвазии [2, 14].

### ***1.2.1 Повреждение молекул АФК***

АФК образуются в ферментативных реакциях с участием NADPH-зависимых оксидаз, ксантинооксидазы, несвязанной эндотелиальной синтазы оксида азота, а также метаболических ферментов, таких как цитохром P450, липоксигеназы и циклооксигеназы [2, 12]. АФК образуются в митохондриях при переносе электронов I, II и III комплексов электрон-транспортной цепи. При формировании комплекса, электрон, высвобожденный из дыхательной цепи, может реагировать с молекулярным кислородом, образуя его активные формы. Генерируемый супероксидный анион-радикал  $\cdot\text{O}_2^-$  устраняется супероксиддисмутазой (SOD), но продуктом этой реакции является  $\text{H}_2\text{O}_2$  [15]. В присутствии катионов металлов, таких как  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  может быть дополнительно восстановлен в  $\cdot\text{OH}$ , чрезвычайно реакционноспособную форму АФК, которая характеризуется сильным окислительным потенциалом, ответственным за клеточное повреждение, вызванное окислительным стрессом [12, 13, 15].

Мозг особенно восприимчив к разрушительным эффектам АФК из-за его высокой метаболической активности и относительно уменьшенной способности к регенерации клеток [14]. Сообщалось, что АФК могут вызывать гибель нейронов и астроцитов через механизмы апоптоза и некроза [2, 14].

### ***1.2.2 Роль АФК в патогенезе глиом***

ROS могут стимулировать в физиологических условиях пролиферацию клеток, активирующих связанные с ростом сигнальные пути [13]. Однако различные АФК оказывают неодинаковое биологическое действие, а раковые клетки из-за их высокой базальной скорости метаболизма, по сравнению с нормальными, более восприимчивы к терапевтическим агентам, нацеленным на редокс-статус клеток.

Были разработаны противораковые лекарственные средства, которые разрушают злокачественные клетки, приводящие к образованию внутриклеточных АФК [2, 16]. Новые агенты обычно индуцируют увеличение уровней АФК (окислительная терапия), вызывающих гибель клеток в процессе апоптоза или некроза, в зависимости от субъекта окислительного повреждения [14, 16]. Эти молекулы могут действовать как прямые ингибиторы рака и / или сенсибилизировать раковые клетки к первоначальному лечению, однако их использование связано со значительной токсичностью и побочными эффектами.

В целом, терапевтически воздействовать на клетки глиомы очень сложно, также учитывая количество их сигнальных путей [13, 16]. Вероятно, что лучшее понимание на молекулярном уровне окислительно-восстановительного статуса глиомы может открыть соответствующие стратегии селективной модуляции АФК при этом типе рака [2].

### ***1.2.3 Применение химиотерапии и определение АФК***

Большинство химиотерапевтических препаратов генерируют АФК в раковых клетках. Существуют две основные причины повышения выработки АФК в клетках во время химиотерапии: генерация АФК в митохондриях и ингибирование клеточной антиоксидантной системы [14, 17, 18].

Вопросы, касающиеся роли АФК в химиотерапии, сосредоточены на том, являются ли АФК основной причиной индукции гибели клеток или просто побочным эффектом, вызванным механизмом гибели клеток из-за химиотерапии [14, 16]. Динамическая последовательность некоторых видов химиотерапии, в том числе длительное воздействие АФК, для корректировки клеток может в итоге способствовать эволюции эластичных и лекарственно-устойчивых клеток, которые могут заселять опухоль и способствовать появлению новой гетерогенной, более метастатической и химиорезистентной опухоли [14, 16, 17, 18].

Несмотря на то, что существует множество подходов к количественному мониторингу активности АФК, ни одна из этих технологий не достигла стандарта, обеспечивающего клиническое обнаружение АФК [18]. На сегодняшний день разработаны флуоресцентные зонды, чтобы отслеживать динамику конкретных АФК в режиме реального времени [17, 19, 20]. Эти зонды обычно объединяют специфическую чувствительную группу для АФК с подходящими люминофорами, такими как комплексы флуоресцеина, родамина, кумарина и др. [19, 20].

Последнее поколение флуоресцентных молекулярных зондов становится все более привлекательным благодаря их преимуществам, таким как высокая чувствительность и специфичность, быстрый анализ и простота управления [19, 20]. Это позволяет идентифицировать специфичные для рака редокс-зависимости, которые могут быть терапевтически активны [20]. Однако узкими местами этих молекулярных зондов являются трудности в отслеживании динамического поведения АФК из-за их короткого периода полураспада и низкой эффективности нацеливания [19].

### **1.3 Аптамеры, как перспектива в лечении онкопатологий**

Поиск молекулярных маркеров для диагностики и терапии онкопатологий затруднён, так как приходится сравнивать качественно и количественно некую совокупность из сотен тысяч белков [21]. Выявление таких специфических маркеров и адресная доставка терапии к ним возможны с помощью использования аптамеров для высоко аффинного обогащения белков, соответствующих определённым заболеваниям.

Аптамеры – это короткие одноцепочечные олигонуклеотиды (ДНК или РНК) размером 30-100 остатков, селективно связывающиеся с мишениями. Впервые они были описаны в 1990 году и также известны под названием «химические антитела» [22]. Этот термин был введен из-за сходства между антителами и аптамерами в том, что они специфически связываются со своей

мишенью через механизм индуцированного соответствия [23]. Специфичность и аффинность аптамеров связана с многообразием возможных конформаций олигонуклеотидов, функциональные группы которых участвуют в образовании водородных связей, электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий с функциональными группами молекулярной мишени: белками, малыми органическими молекулами, антителами, клетками, тканями [24].

### ***1.3.1 Метод SELEX для отбора аптамеров***

Аптамеры генерируются с использованием полностью *in vitro* процесса, известного как Систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX), который включает в себя повторяющиеся циклы инкубации рандомизированной библиотеки последовательностей нуклеиновых кислот с интересующей мишенью [22, 25, 26]. Библиотека олигонуклеотидов случайной последовательности охватывает 20-100 остатков в длину, и каждый нуклеотид окружает постоянные последовательности, необходимые для ферментативной манипуляции [24]. Пул содержит от  $1 \times 10^{13}$  до  $1 \times 10^{15}$  элементов, хотя утверждается, что еще менее разнообразные пулы дадут полезные аптамеры [23].

В результате этого процесса скрининга только те последовательности, которые связываются с высокой аффинностью к мишени, распространяются на следующий раунд отбора [22]. Для обеспечения специфичности связанных последовательностей в протокол включается негативная селекция с подобными белками или молекулами-мишениями [25].

Дальнейшее определение последовательности аптамера позволяет химически синтезировать его, что приводит к отсутствию периодического изменения. Это явление даёт аптамерам их наибольшее преимущество перед

обычными антителами в том, что они могут быть синтезированы со 100% воспроизводимостью [22].

### ***1.3.2 Преимущества аптамеров перед антителами***

Функционально аптамеры - аналоги белковых антител, однако эти олигонуклеотиды определяются последовательностью и химически синтезируются, следовательно, представляют собой рентабельную, высокоустойчивую и легко модифицируемую альтернативу антителам [22, 26].

Преимуществами аптамеров для их использования в качестве средств диагностики и терапии являются: малый размер (5-30 кДа, 2 нм.); высокоспецифичность за счет формирования трехмерных структур при связывании с молекулой-мишенью; относительно низкая стоимость (в 100 раз ниже, по сравнению с моноклональными антителами); возможность химического синтеза; термостабильность; возможность подбора практически к любым биологическим мишениям; они не токсичны и не иммуногенны [26, 27]. Аптамеры легко модифицируются, приобретая новые свойства, которые позволяют им выполнять разнообразные функции. Наиболее распространенный способ - модификация аптамеров флуоресцентной меткой, что позволяет идентифицировать мишень [24, 28].

Главная проблема использования антител - воспроизводимость [22, 26]. Известно более 3,8 миллионов таких антител, продаваемых множеством различных компаний, и вместе с тем вариативных между поставщиками и партиями [22]. Поэтому речь заходит о об эффективности их использования для биологических анализов.

### ***1.3.3 Преимущества аптамеров в диагностическом применении***

В рамках диагностической патологии и клинических лабораторий, существуют специализированные тесты, которые полагаются на

использование антител. К таким тестам относится, например, иммуногистохимия [22].

Иммуногистохимия (ИГХ) проводится для определения наличия или отсутствия специфических биомаркеров при онкологии [29]. Исследования, в которых аптамеры сравнивались с антителами для гистохимического окрашивания участков тканей, показали, что аптамеры демонстрируют гораздо меньшее фоновое окрашивание, более чувствительное обнаружение и более короткий инкубационный период [22]. При этом более короткий инкубационный период (15-20 мин, против 24 часов) указывает на возможность использования аптамеров для интраоперационных процедур.

Аптамеры были также исследованы как молекулярные замены зонда для антител в ELISA-подобных иммуноферментных анализах, под названием "ELASA" (enzyme linked apta-sorbent assay) [22, 26, 29]. Результаты исследований показали, что каждый из них продемонстрировал повышенную чувствительность и уменьшенный предел обнаружения, по сравнению с антителами в ELISA.

Таким образом, аптамеры обладают потенциалом более эффективного использования для мультиплексного количественного определения поверхностных маркеров клеток [23, 26, 27].

#### **1.4 Квантовые точки**

Квантовые точки (QD или КТ) – коллоидные полупроводниковые нанокристаллы с размером в диапазоне 2-10 нм, обычно состоящие из  $10^3$  -  $10^5$  атомов на основе неорганических полупроводниковых материалов и покрытые слоем молекул органического стабилизатора [30]. Квантовые точки состоят из атомов групп II-VI (например, CdSe, CdS, CdTe, ZnSe), III-V (InP и InAs) и IV-VI (PbSe) [31].

Структурно КТ состоит из металлокристаллического ядра, которое, в зависимости от его состава и размера, придаёт тип флуоресценции, которую

она излучает [30, 31]. Сердцевина КТ состоит из таких материалов, как кадмий-сelen (CdSe), кадмий-теллур (CdTe) и др. Органические покрытия, сульфид цинка (ZnS) могут служить полупроводниковой оболочкой, которая стабилизирует сердечник и улучшает оптические и физические свойства, а также биодоступность материала [32]. Поверхностные группы на полимерных покрытиях, такие как -COOH или -NH<sub>2</sub>, доступны для ковалентного связывания биоактивных молекул.

Спектр энергии зависит от размера квантовой точки. Соответственно, длиной волны поглощения или эмиссии можно управлять, изменяя размеры КТ [30]. Чем больше точка, тем ближе к красному концу спектра её флуоресценция, и наоборот [30, 33]. Красная флуоресцентная эмиссия к тому же является предпочтительным цветом в биологических исследованиях из-за явлений аутофлуоресценции клеток в диапазоне 400–600 нм (синий, зеленый и желтый спектры) [34].

Квантовые точки характеризуются значительным потенциалом практического применения. Они отличаются 1) широкими и последовательными полосами возбуждения, высокой поглощающей способностью [35]; 2) узким и симметричным излучением в диапазоне электромагнитных волн: от ультрафиолетового до инфракрасного [31]; 3) длительным временем жизни флуоресценции - до 200 наносекунд [31]; 4) хорошей фотостабильностью с низкой склонностью к фотообесцвечиванию [33, 35] 5) высоким квантовым выходом флуоресценции [31, 36].

Кроме применения в оптоэлектронических системах, QD используют как флуоресцентные метки в качестве биологических маркеров [30]. При целевой визуализации квантовые точки, нацеленные на опухоли или биомаркеры, играют решающую роль в обнаружении рака (в том числе глиомы головного мозга [37, 38]), терапии, мониторинге и прогностической оценке [34]. Благодаря своим характеристикам, КТ способны преодолевать ГЭБ и подходят для наблюдения в режиме реального времени [37, 38]. Однако для

диагностических применений, потенциальная токсичность, вызванная выделением ионов металлов, остается основным ограничением использования КТ, несмотря на многие противоречия в литературе.

#### ***1.4.1 Функционализация поверхности и оформление КТ***

Модификация поверхности и стабилизация КТ, по-видимому, являются наиболее важными шагами для регуляции биологических функций (например, цитотоксичности) и успешного биомедицинского использования [31, 32]. Поверхность КТ должна быть оформлена, потому что: (а) большинство синтезированных КТ нерастворимы в воде и должны быть модифицированы, чтобы стать гидрофильными; (б) непокрытые КТ очень реактивны и, так как сделаны из тяжелых металлов, могут вызывать нежелательные токсические эффекты при применении на моделях клеток / животных [31, 37]. Однако соответствующий метод покрытия, по-видимому, эффективно снижает такие непреднамеренные воздействия на биомолекулы [28, 34].

Чтобы стать функционализированными умными наносистемами, КТ должны быть сшиты с желаемыми небольшими молекулами или лигандом биомолекул (например, аптамером). Такая система может быть инициирована через различные функционализированные карбоксильные, тиольные и аминные группы [31, 33].

Конъюгирование КТ с другими макромолекулами / малыми молекулами может быть осуществлено с использованием различных методов конъюгации, таких как N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодииimid (EDAC) вместе с натриевой солью N-гидроксисульфосукцинида (Sulfo-NHS) [31, 33]. Используемый здесь термин «карбодииimid» относится к классу органических веществ, включающих фрагмент R-N=C=N-R'. Группы R и R' могут быть любыми органическими радикалами. Sulfo-NHS используются для получения аминореактивных сложных эфиров

карбоксилатных групп для химической маркировки, сшивания и твердофазной иммобилизации. Карбоксилаты (-COOH) могут реагировать Sulfo-NHS в присутствии карбодиимида, такого как EDAC, что приводит к получению полустабильного эфира Sulfo-NHS, который затем может реагировать с первичными аминами (-NH<sub>2</sub>) [33].

#### ***1.4.2 Квантовые точки на основе кадмия (Cd). Исследование токсичности***

В настоящее время наиболее распространенный элемент тяжелых металлов, используемый для синтеза КТ - кадмий. Он содержится в нанокристаллическом ядре, которое может быть покрыто core-shell - оболочкой из сульфида цинка (ZnS), сульфида кадмия (CdS (-COOH)), но до сих пор не известно, будут ли эти высвобождённые Cd<sup>2+</sup> влиять на использование КТ [31, 39]. Также большое беспокойство вызывает то, что КТ могут агрегировать в мембранные структуры и внутриклеточные белки, вызывая образование АФК. Несмотря на множество исследований токсичности КТ, трудно полностью понять её механизм *in vitro* и *in vivo*, поскольку существует много расхождений в оценке [31, 32, 39].

Чтобы исследовать механизм токсичности, связанный с КТ *in vitro* и *in vivo*, Winnik и Maysinger в 2013 году разработали эксперименты по определению токсичности, которые проводились с использованием различных типов КТ в отношении их диапазонов размеров, комбинаций материалов и покрытия поверхности [39]. На рисунке 1 представлен обзор механизмов клеточной токсичности, которые запускаются внедрением КТ.

Cd<sup>2+</sup> может высвобождаться в цитоплазму посредством окисления КТ и затем связываться с сульфидрильными группами на многих внутриклеточных белках, что приводит к снижению функциональности в различных субклеточных органеллах [37, 39].

Индуцированная КТ, считается еще одним важным фактором цитотоксичности. Фоточувствительные КТ переносят электрон к

молекулярному кислороду в растворе, вызывая образование синглетного кислорода, который реагирует с водой или другими молекулами, вызывая образование АФК ( $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [39].

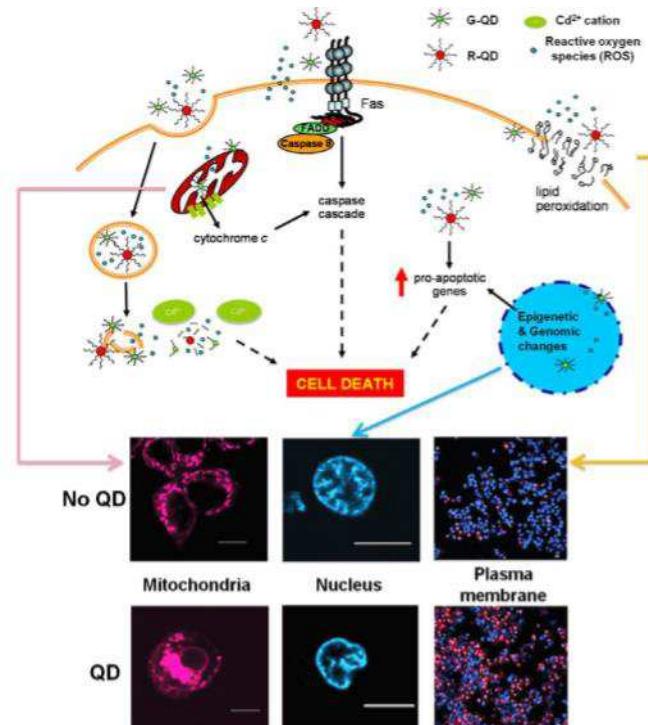


Рисунок 1 – Механизмы клеточной токсичности, запускаемые воздействием КТ [39]

Цитотоксичность может быть легко измерена *in vitro* с помощью анализов проницаемости мембран или метаболической активности, *in vivo* это сделать сложнее. Жизнеспособность организма и сублетальная токсичность такая, как повреждение органов, обычно рассматриваются в исследованиях *in vivo*. Например, было показано, что почечный клиренс во многом зависит от гидродинамического диаметра КТ CdSe / ZnS. КТ с меньшим размером (<5,5 нм) можно было бы легче устраниć с помощью выделения с мочой. Напротив, КТ с большим размером (> 10 нм) практически не выводились из организма [39].

В исследованиях ранее сообщалось, что использование ряда КТ CdTe, диспергированных в воде, CdTe/CdS и CdTe/CdS/ZnS может хорошо переноситься даже при очень высокой концентрации и длительной

инкубации различными клеточными линиями. То есть, КТ с покрытием показали снижение общей токсичности [31, 34].

Размер комплексов КТ исключает почечную экскрецию, что делает выведение из кровотока маловероятным. Это может привести к возможному поглощению и концентрации в печени, которая особенно чувствительна к токсичности кадмия [37]. Стоит отметить, что в исследованиях гибель первичных гепатоцитов, выделенных от крыс, в значительной степени зависела от условий обработки и дозы КТ.

Позже исследователями изучалось краткосрочное и долгосрочное биораспределение *in vivo*, фармакокинетика и токсичность водно-синтезированных квантовых точек (aqКТ) у мышей. Эти исследователи показали, что аqКТ могут первоначально накапливаться в печени через 0,5-4 часа после инъекции, затем в почках и кровообращении в течение длительного времени (15-80 дней) [37]. Их результаты подчеркнули, что аqКТ вызывают незначительную токсичность у мышей даже при длительном воздействии.

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Материалы и реагенты:**

1. 1,7 мл эплендорф
2. 1,7 мл эплендорф с фильтром Cutoff
3. Чашки Петри
4. Шприц
5. АФК-зависимый зонд, 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (Sigma-Aldrich)
6. Диметилсульфоксид (DMSO)
7. N-Hydroxysulfosuccinimide sodium / Sulfo-NHS
8. 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, 98% / EDAC
9. MQ (бидистиллярованная вода)
10. Квантовые точки с –COOH группой
11. NH<sub>2</sub>-Праймер (5'-CGTGGTTACAGTCAGAGGAGAA/NH<sub>2</sub>-/3')
12. Фосфатный буфер (PBS<sup>(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)</sup>)
13. ДНК-аптамер Gli\_781\_100 (5'- CTCCTCTGAC TGTAACCACG CGTGCATGTA AAGGCGCACA TACCTCTTAC ATTTGCTTGC GGAGATGCTT AATGTATTG TGCTGCATAG GTAGTCCAGA AGCC -3')
14. Диэтиловый эфир

### **Оборудование:**

- Центрифуга Eppendorf MiniSpin
- Multi-Vortex V-32 BioSan
- Система гель-документации GBOX Syngene
- Хирургический микроскоп OPMI Pentero (Carl Zeiss, Germany)
- УФ-фонарик
- Ультразвуковая ванна «Сапфир»
- Инвертированный микроскоп (PrimoVert, Zeiss)

## 2.2 Метод конъюгации квантовых точек с праймерами

В работе используются водо-диспергируемые полупроводниковые квантовые точки с концентрацией  $10^{-5}$  М типа CdTe («ядро»), стабилизированные тиогликолевой кислотой (ТГК), производства PlasmaChem (Германия) (рис. 2) [36]. Поверхностная группа -COOH доступна для ковалентного связывания с аптамерами.

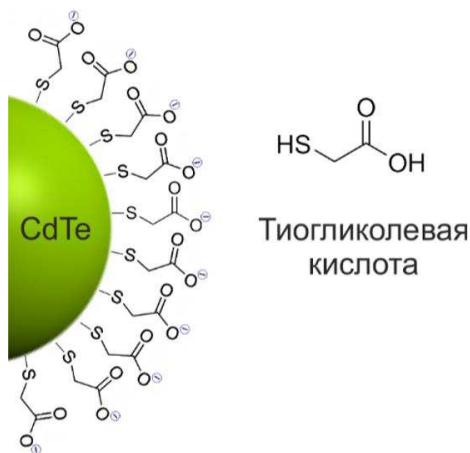


Рисунок 2 – Схема строения CdTe квантовых точек [36]

Для активации квантовых точек используется реакционная смесь, в состав которой входит 1 мг Sulfo-NHS, 0,5 мкл EDAC (98%) и 1 мл MQ. Смесь тщательно перемешивается и ставится в ультразвуковую ванну «Сапфир» на 10 мин. Затем добавляются 3 мкл квантовых точек (КТ), модифицированных карбоксильными группами, и 100 мкл 10 мкМ праймера. Реакционная смесь инкубируется в Multi-Vortex в течение 2-х часов.

Через 2 часа квантовые точки, конъюгированные с праймером, отделяют от свободных праймеров и реагентов. Очистка КТ проводится с помощью cutoff фильтра эплендорфа №1, который помещается в центрифугу на 15 мин, максимальная скорость 14,3 тыс. об./мин. Осаждённые на фильтре КТ промываются фосфатным буфером и сливаются в чистый эплендорф №2. Оценка связывания квантовых точек с праймером осуществляется с помощью системы гель-документирования GBOX Syngene (рис. 3). Появление флуоресценции в одном эплендорфе с квантовыми точками

свидетельствует о том, что праймеры, конъюгированные с квантовыми точками не проходят через фильтр. Несвязанные праймеры проходят через фильтр и остаются в эплендорфе №1.

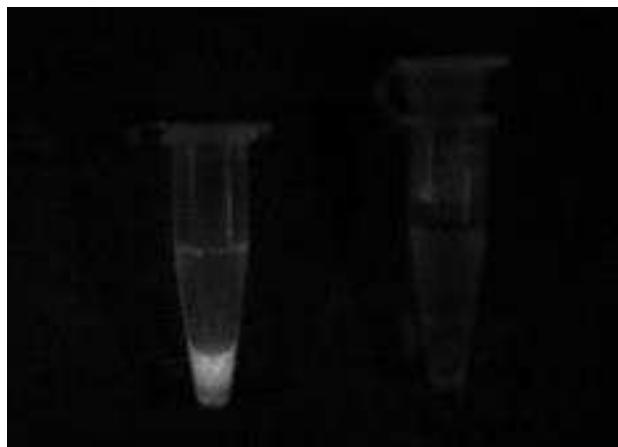


Рисунок 3 – Оценка образования конъюгатов квантовых точек с праймерами с помощью системы гель-документации GBOX Syngene (голубой свет, UV фильтр). Справа эплендорф №1, слева - №2

К конъюгатам квантовых точек с праймером добавляют в эквимолярном количестве аптамер Gli\_781\_100 к глиобластоме. Смесь инкубируют в течение 30 мин на Multi-Vortex.

### **2.3 Первоначальная оценка связывания препарата с послеоперационным материалом ткани глиобластомы**

Для первоначальной оценки связывания препарата с глиобластомой используется 3 мкл КТ. Ткань глиобластомы забирается во время операции в стерильные пробирки объемом 15 мл с питательной средой, содержащей 5 мл холодного раствора Хэнкса (HBSS) с 10%-ными антибиотиками (антибиотик - антимикотический), у онкологического больного, находящегося в Красноярской межрайонной клинической больнице скорой медицинской помощи им. Н. С. Карповича. Забор материала осуществляется с одобрения этического комитета и с информированного согласия пациента. Ткань быстро доставляется на сухом льду в Красноярский государственный медицинский университет для дальнейшей работы.

В вытяжном шкафу избыток раствора Хенкса в пробирке с глиобластомой удаляется пипеткой. После этого ткань промывается 3 раза 5 мл холодным PBS<sup>(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)</sup> для удаления клеток крови. Затем глиобластома переносится в чашку Петри, заполненную 1 мл PBS<sup>(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)</sup>. В ней с помощью щипцов, ножниц и скальпеля удаляются некротические ткани и сгустки крови.

Опухолевая ткань разделяется на части с целью приготовления двух опытных проб. В первом эппendorфе находится часть ткани, во втором – выделенные клетки. В обе пробы добавляется заранее приготовленный препарат-спрей, с которым они инкубируются 5 мин на Multi-Vortex. Далее пробы центрифугируются 5 мин при 3000 об/мин, супернатант удаляется. Затем обе пробы снова центрифугируются при тех же условиях, но уже с фосфатным буфером, супернатант удаляется. Эта процедура необходима для очистки опухолевых клеток и ткани, конъюгированных с комплексом «аптамер-праймер-КТ», от несвязавшихся комплексов. После удаления супернатанта в оба эппendorфа вновь добавляется PBS<sup>(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)</sup> и пробы перемешиваются.

С помощью системы гель-документирования GBOX Syngene оценивается связываемость образца опухоли и выделенных из неё клеток с препаратом на основе аптамеров, конъюгированных с квантовыми точками, по свечению флуоресценции. По снимку видно, что флуоресценция проявляется в обеих пробах (рис. 4). Это доказывает связь комплекса «аптамер-праймер-КТ» с образцом опухоли и с выделенными из него опухолевыми клетками.

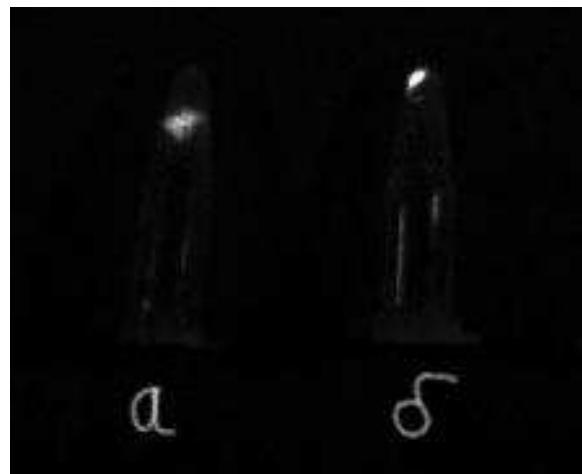


Рисунок 4 – Оценка связывания препарата с аптамером к глиобластоме по флуоресценции: а) образец ткани; б) опухолевые клетки

#### **2.4 Определение острой токсичности спрея *in vivo* в эксперименте с мышами**

Исследование токсичности квантовых точек проводится с целью определения влияния однократного введения дозы спрея на животных. В эксперименте используются белые мыши ICR в соответствии с принципами и протоколами, предусматривающими гуманное отношение к лабораторным животным.

Эксперимент повторяет основные этапы методики получения препарата-спрея, основанного на квантовых точках, конъюгированных с ДНК-аптамером, из пункта 2.2 данной работы. Изменяется лишь концентрация реагентов в расчёте на количество мышей.

Перед этапом очистки квантовых точек изменяется соотношение веществ. Состав реакционной смеси: 1 мг Sulfo-NHS, 0,5 мкл EDAC (98%) и 1029 мкл MQ. Квантовые точки (QD) с карбоксильными группами добавляются в объёме 15 мкл, а 10 мкМ NH<sub>2</sub>-Праймер – в объёме 116 мкл.

После очистки квантовых точек раствор разделяется по 570 мкл в 2 пробы, вторая из которых используется для других целей. В первую же пробу вносится 30 мкл ДНК-аптамера Gli\_781\_100 к глиобластоме, после чего она инкубируется по методике в течение 30 мин.

Общий объём спрея с аптамером составляет 600 мкл с учётом возможных потерь при его впрыскивании. Он рассчитан на 2 группы опытных мышей, разделённых по половому признаку, в каждой по 5 животных. В хвостовую вену каждой из 10 мышей с использованием шприца вводится по 50 мкл объёма исследуемого препарата.

Для изучения острой токсичности оригинального препарата 5 мышей соответствуют рекомендованному минимальному размеру группы особей для грызунов. В эксперименте были задействованы четыре группы, по 5 мышей в каждой из двух опытных и двух контрольных групп:

1. Опыт, самки (n=5);
2. Опыт, самцы (n=5);
3. Контроль, самки (n=5);
4. Контроль, самцы (n=5).

Мышам контрольных групп спрей не вводился. Все мыши находились в равных условиях.

Наблюдение эффекта исследуемого конъюгата аптамеров с КТ после введения осуществляется в течение 14 дней. На 15-ый день происходит изъятие печени, почек, головного мозга исследуемых четырёх групп мышей, наркотизированных диэтиловым эфиром. Органы опытных и контрольных мышей измельчаются с помощью скальпеля в чашках Петри до превращения в суспензию клеток, которые затем инкубируются с флуоресцентным зондом на АФК.

В качестве зонда используется 1 мг 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата (Sigma-Aldrich), к которому добавляется 50 мкл диметилсульфоксида (DMSO), применяемого в качестве растворителя. Объём доводится до 1 мл фосфатным буфером (PBS  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Под действием диметилсульфоксида зонд становится липофильным и способным проникнуть через клеточную мембрану.

К клеточной суспензии каждого исследуемого органа добавляется по 20 мкл готового АФК-зависимого зонда, в конечной концентрации 20 мкМ, с которым выделенные клетки органов инкубируются в течение 5 мин. По завершении инкубации 10 мкл клеток наносятся на предметное стекло, которое затем помещается на предметный столик инвертированного микроскопа (PrimoVert, Zeiss), и фиксируется степень проявления флуоресценции прижизненных препаратов.

## **2.5 Выявление АФК флуоресцентным зондом с помощью микроскопии**

Принцип метода основан на взаимодействии клетки с АФК- зависимым зондом, способным к флуоресценции. Таким зондом является 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH<sub>2</sub>-DA). Он представляет собой бесцветный не флуоресцентный краситель, способный диффундировать через липидную мембрану клеток [40].

Флуоресцентный зонд после диффузии в клетку деацетилируется внутриклеточными эстеразами с образованием DCFH<sub>2</sub>, не флуоресцирующего соединения, которое обладает меньшей способностью проникать через клетки, что объясняется наличием заряда. Далее окисление внутриклеточными активными формами кислорода DCFH<sub>2</sub> приводит к образованию 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) (рис. 5), способного интенсивно флуоресцировать в зеленой части спектра (максимум возбуждения 485-500 нм) [40].

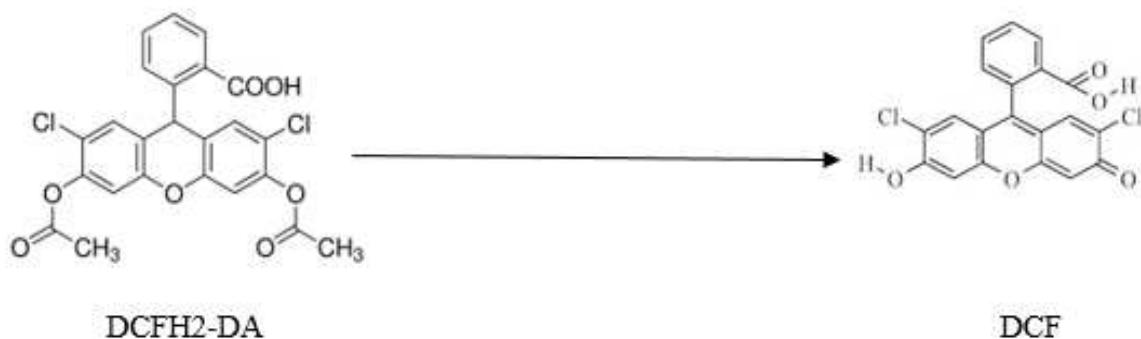


Рисунок 5 – Схема образования 2',7'-дихлорфлуоресцина (DCF)

DCFH<sub>2</sub>-DA позволяет детектировать такие виды АФК, как пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ ), пероксинитрит-ион ( $ONOO^-$ ), супероксидный радикал ( $\cdot O_2^-$ ). Наличие АФК в пробе определялось по средней интенсивности флуоресценции под микроскопом.

### **3 Результаты исследования и обсуждения**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В лабораторных условиях был разработан метод интраоперационного окрашивания глиобластомы с использованием аптамеров, конъюгированных с квантовыми точками (QD). Способность полученного препарата конъюгатов квантовых точек с аптамерами визуализировать опухолевые клетки в ткани глиобластомы подтвердилась.

За счёт яркости квантовых точек опухолевые клетки стало возможным визуализировать без хирургического микроскопа, используя только ультрафиолетовый фонарь и соответствующий фильтр. Кроме того, QD, в отличие от большинства нанозондов, обладают красной флуоресцентной эмиссией, которая является предпочтительным цветом в биологических исследованиях из-за явлений autofluoresценции клеток в диапазоне 400–600 нм.

Важно отметить, что токсичность препарата не была выявлена. Поэтому он имеет потенциал быть использованным для пациентов при интраоперационной визуализации злокачественных очагов глиобластомы.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- ГБМ – мультиформная глиобластома  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер  
АФК (ROS) – активные формы кислорода  
 $\bullet\text{O}_2^-$  – супероксидный радикал  
 $\bullet\text{OH}$  – гидроксильный радикал  
 $\text{NO}\bullet$  – монооксид азота  
 $\text{ONOO}^-$  – пероксинитрит-ион  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  – перекись водорода  
SELEX – систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением  
КТ (QD) – квантовые точки  
Sulfo-NHS – натриевая соль N-гидроксисульфосукцинида  
EDAC – N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодииimid  
 $\text{PBS}^{(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})}$  – фосфатно-солевой буфер  
DCFH2-DA – 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат  
DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Nam, L. Drug Delivery Nanosystems for the Localized Treatment of Glioblastoma Multiforme / L. Nam [et al.] // MDPI — Materials. — 2018. - Vol. 11, № 779 – P. 1-7.
2. Lukas, R. V. Newly diagnosed glioblastoma: a review on clinical management / R. V. Lukas [et al.] // Oncology. — 2019. — Vol. 33, № 3 – P. 91-100.
3. Testa, U. Genetic abnormalities, clonal evolution, and cancer stem cells of brain tumors / U. Testa [et al.] // Medical sciences. — 2018. — Vol. 6, № 4 – P. 1-102.
4. Hays, E. M. Aptamers and glioblastoma: their potential use for imaging and therapeutic applications / E. M. Hays [et al.] // International journal of molecular sciences. — 2017. — Vol. 18, № 12 – P. 1-17.
5. Touat, M. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights / M. Touat [et al.] // Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology. — 2017. — Vol. 28, № 7 – P. 1457-1472.
6. Trejo-Solís, C. Autophagic and apoptotic pathways as targets for chemotherapy in glioblastoma / C. Trejo-Solis [et al.] // International journal of molecular sciences. — 2018. — Vol. 19, № 12 – P. 1-54.
7. Da Ros, M. Glioblastoma chemoresistance: the double play by microenvironment and blood-brain barrier / M. Da Ros [et al.] // International journal of molecular sciences. — 2018. — Vol. 19, № 10 – P. 1-23.
8. Viswanadh, M. K. Nanotheranostics: emerging strategies for early diagnosis and therapy of brain cancer / M. K. Viswanadh [et al.] // Nanotheranostics. — 2018. — Vol. 2, № 1 – P. 70-86.
9. Alfonso, J. C. L. The biology and mathematical modelling of glioma invasion: a review / J. C. L. Alfonso [et al.] // J. R. Soc. Interface. — 2017. – Vol. 14, № 136 – P. 1-7.

10. Rinaldi, M. ROS and Brain Gliomas: An Overview of Potential and Innovative Therapeutic Strategies / M. Rinaldi [et al.] // International Jornal of Molecular Sciences. – 2016. – Vol. 17, № 984 – P. 1-10.
11. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12, № 4 – С. 13-19.
12. Moloney, J. N. ROS signalling in the biology of cancer / J. N. Moloney, T. G. Cotter // Seminars in cell and developmental biology. — 2018. — Vol. 80 – P. 50-64.
13. Benfeitas, R. (2017). New challenges to study heterogeneity in cancer redox metabolism / R. Benfeitas [et al.] // Frontiers in cell and developmental biology. — 2017. — Vol. 5, № 65 – P. 1-20.
14. De Sá Junior, P. L. The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy / P. L. de Sá Junior [et al.] // Oxidative medicine and cellular longevity. — 2017. — Vol. 2017 – P. 1-12.
15. Zhou, Y. Potential implications of hydrogen peroxide in the pathogenesis and therapeutic strategies of gliomas / Y. Zhou [et al.] // Archives of Pharmacal Research. — 2020. — Vol. 43, № 2 – P. 187-203.
16. Cui, Q. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer / Q. Cui [et al.] // Drug resistance updates. — 2018. — Vol. 41 – P. 1-25.
17. Yang, H. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy / H. Yang [et al.] // Journal of experimental & clinical cancer research. – 2018. – Vol. 37, № 1 – P. 1–8.
18. Xu, J. Dual Roles of Oxidative Stress in Metal Carcinogenesis / J. Xu [et al.] // Journal of environmental pathology, toxicology and oncology. – 2017. – Vol. 4, № 36 – P. 345–367.

19. Wu, L. Reaction-based fluorescent probes for the detection and imaging of reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species / L. Wu [et al.] // Accounts of Chemical Research. — 2019. — Vol. 52, № 9 – P. 2582-2597.
20. Andina, D. Ratiometric fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species / D. Andina [et al.] // Chemistry - A european journal. — 2017. — Vol. 23, № 55 – P. 13549-13573.
21. Комарова, М. А. Селекция аптамеров к глиобластоме / М. А. Комарова [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – Т. 101, № 5. – С. 93-95.
22. Bauer, M. Anything you can do, I can do better: can aptamers replace antibodies in clinical diagnostic applications? / M. Bauer [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24, № 23 – P. 1-13.
23. Zhou, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges / J. Zhou, J. Rossi // Nature reviews. Drug discovery. — 2017. — Vol. 16, № 3 – P. 181-202.
24. Замай, А. С. Технологии получения и использования ДНК - аптамеров для разработки новых средств диагностики и терапии : дис. ... д-ра биол. наук - 03.01.04 / Замай Анна Сергеевна. – Красноярск, 2014. – 334с.
25. Mercier, M. C. Selection of nucleic acid aptamers targeting tumor cell-surface protein biomarkers / M. C. Mercier [et al.] // Cancers. — 2017. — Vol. 9, № 6 – P. 1-33.
26. Pan, Q. Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases / Q. Pan [et al.] // The Journal of infection. — 2018. — Vol. 77, № 2 – P. 83-98.
27. Keefe, A. D. Aptamers as therapeutics / A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington // Nature Reviews Drug Discovery. – 2010. – Vol. 9, № 537 – P. 1-12.
28. Ciancio, D. R. Aptamers as Diagnostic Tools in Cancer / D. R. Ciancio [et al.] // Pharmaceuticals. — 2018. — Vol. 11, № 3 – P. 1-23.
29. Kaur, H. Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines / H. Kaur [et al.] // Theranostics. — 2018. — Vol. 8, № 15 – P. 4016-4032.

30. Васильев, Р. Б. Квантовые точки: синтез, свойства, применение // ФНМ. — 2007. — № 13 — С. 1–32.
31. Mashinchian, O. Impact of quantum dots in molecular detection and bioimaging of cancer / O. Mashinchian [et al.] // BioImpacts. — 2014. — Vol. 4, № 3 – P. 149-166.
32. Medintz, I. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing / I. Medintz [et al.] // Nature Materials. — 2005. — Vol. 4, № 6 – P. 435-446.
33. Pat. 0024047 United States, Int. Cl. G 01 N 21/64. Coated quantum dots and methods of making and using thereof [Text] / Kairdolf Brad A. (Lilburn, GA), Nie Shuming (Atlanta, GA) ; Assignee Emory University (Atlanta, GA). — Appl. № 13/916,937 ; Filed June 13, 2013 ; Publ. January 23, 2014. – 10 pp.
34. Filali, S. Biological applications and toxicity minimization of semiconductor quantum dots / S. Filali [et al.] // Trends in Biotechnology. — 2019. — Vol. 38, № 2 – P. 163-177.
35. Wen, L. Aptamer-modified semiconductor quantum dots for biosensing applications / L. Wen [et al.] // Sensors. — 2017. — Vol. 17, № 8 – P. 1-14.
36. Слюсаренко, Н. В. Оптические свойства субмикронных композитов, полученных самосборкой коллоидных квантовых точек и разнозаряженных биополимеров: дис. ... к-та физ.-мат. наук: 01.04.05 / Слюсаренко Нина Викторовна. – Красноярск, 2018. – 123 с.
37. Jha, S. Pharmaceutical potential of quantum dots / S. Jha [et al.] // Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. — 2017. — Vol. 46, № 1 – P. 57-65.
38. Chen, X. Quantum dot-labeled aptamer nanoprobes specifically targeting glioma cells / X. Chen [et al.] // Nanotechnology. — 2008. — Vol. 19, № 23 – P. 1-6.
39. Mo, D. Cadmium-containing quantum dots: properties, applications, and toxicity / D. Mo [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2017. — Vol. 101, № 7 – P. 2713-2733.

40. Лобанова, М. В. Особенности реализации окислительного стресса в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках при различном содержании кислорода: дис. ... к-та биол. наук: 03.03.01, 03.03.04 / Лобанова Маргарита Владимировна. – Москва, 2015. – 120 с.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
*Ellen* Е. И. Шишацкая  
«6 » июль 2020 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Разработка препарата для интраоперационного окрашивания глиобластомы и  
оценка его токсичности

Руководитель  
Доцент, канд. бiol. наук *Н.М. Титов* 29.06.2020 Н. М. Титова

Консультант  
Профессор, д-р бiol. наук *Т.Н. Замай* 29.06.2020 Т. Н. Замай

Выпускник *А.А. Кошманова* 29.06.2020 А. А. Кошманова