

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 рака лёгкого и
оценка его токсичности

Руководитель _____ 30.06.2020 Доцент, канд. биол. наук Н. М. Титова

Консультант _____ 30.06.2020 Профессор, д-р биол. наук Т. Н. Замай

Выпускник _____ 30.06.2020 И. О. Перепелицын

Красноярск 2020

Содержание	
ВВЕДЕНИЕ	4
1 Обзор литературы	6
1.1 Рак лёгких	6
1.2 Канцерогенез.....	9
1.3 Квантовые точки.....	11
1.4 Гибриды квантовых точек и биологических молекул	14
1.5 Аптамеры	16
1.6 АФК.....	23
2 Материалы и методы	28
2.1 Материалы и оборудование	28
2.2 Конъюгация квантовых точек с праймерами	29
2.3 Первичная оценка связывания препарата с послеоперационным материалом больного раком легкого.....	30
2.4 Определение острой токсичности спрея <i>in vivo</i> в эксперименте с мышами.....	32
2.5 Определение АФК методом микроскопии.....	33
3 Результаты исследования и обсуждения.....	35
Заключение.....	36
Список использованных источников	37

Реферат

Выпускная квалификационная работа выполнена по теме «Разработка препарата для интраоперационного окрашивания рака лёгкого и оценка его токсичности» содержит 47 страниц текстового документа, 15 иллюстраций и 47 источников литературы.

**РАК ЛЁГКОГО, АПТАМЕРЫ, КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ,
ИНТРАОПЕРАЦИОННОЕ ОКРАШИВАНИЕ РАКА ЛЁГКОГО, ТЕРАПИЯ
РАКА ЛЁГКОГО.**

Объект – рак лёгкого.

Цель – модифицировать препарат для интраоперационного окрашивания рака легкого на основе аптамеров и квантовых точек и оценить его токсичность.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать способы конъюгации квантовых точек с аптамерами, специфичными раку легкого.
2. Оценить способность конъюгатов квантовых точек с аптамерами визуализировать опухолевые клетки в послеоперационной ткани рака легкого.
3. Оценить токсичность конъюгатов квантовых точек с аптамерами, специфичными раку легкого.

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

Был разработан препарат для интраоперационного окрашивания рака лёгкого. Препарат на основе аптамеров с квантовыми точками позволяет окрашивать раковые очаги в поражённых тканях лёгких, тем самым визуализируя малозаметные раковые клетки без хирургического микроскопа, используя лишь ультрафиолетовый фонарь с подходящими фильтрами.

Отсутствие токсичности позволяет препарату быть кандидатом для применения на пациентах.

ВВЕДЕНИЕ

Рак легких (РЛ) является ведущей причиной смерти от рака в наше время [1]: смертность составляет 17,6%. 5-летняя выживаемость при раке легкого составляет не более 10%. Выявление РЛ в России на I-II стадиях заболевания составляет 27,3%, а на III-IV стадиях – 70,3%. В то же время 5-летняя выживаемость больных после радикального лечения на первой стадии заболевания около 70%, а на IV этапе – менее 5% [2]. По данным разных авторов 10%-30% пациентов с впервые выявленным диагнозом рака лёгкого подвергаются радикальному хирургическому лечению, что связано с его поздним выявлением [3].

Радикальное хирургическое вмешательство является самым эффективным методом лечения рака, лёгкого [4], в связи с чем интраоперационная визуализация патологических очагов в ткани легкого является актуальной задачей, поскольку позволяет уменьшить риск рецидива и прогрессирования онкологического заболевания [2]. Флуоресцентная диагностика повышает эффективность операции за счёт увеличения качества наблюдения опухолевого очага [4].

В последнее время в качестве флуорофоров стали использовать флуоресцентные проводниковые нанокристаллы – квантовые точки (КТ), обладающие рядом преимуществ, отсутствующим у традиционно используемых в биологических исследованиях контрастирующих агентов [5].

Цель – модифицировать препарат для интраоперационного окрашивания рака легкого на основе аптамеров и квантовых точек и оценить его токсичность.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать способы конъюгации квантовых точек с аптамерами, специфичными раку легкого.
2. Оценить способность конъюгатов квантовых точек с аптамерами визуализировать опухолевые клетки в послеоперационной ткани рака легкого.

3. Оценить токсичность конъюгатов квантовых точек с аптамерами, специфичными раку легкого.

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

1 Обзор литературы

1.1 Рак лёгких

Термин «рак легкого» объединяет различные по морфогенезу, клиническим проявлениям, прогнозу и результатам лечения злокачественные эпителиальные опухоли [6].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что рак легких представляет собой группу гистологически и молекулярно гетерогенных заболеваний даже в пределах одного и того же гистологического подтипа [7].

Рак лёгкого можно подразделить на мелкоклеточный (МКРЛ) и немелкоклеточный (НМКРЛ). По частоте встречаемости НМКРЛ составляет 80% и включает в себя гистологические типы, различные по молекулярно-биологическим особенностям и клиническому течению: adenокарциному, диморфный рак, adenокистозный рак, карциноид и мукоэпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, крупноклеточный рак и бронхиолоальвеолярный.

Уровень заболеваемости раком легких варьируется по всему миру, что отражает географические различия в употреблении табака и качестве воздуха. Во всем мире заболеваемость раком легких увеличивается [8]. Уровень заболеваемости раком легких у мужчин значительно выше в развитых странах, чем в менее развитых, в основном связанных с привычками курения, но общая заболеваемость среди мужчин из развитых стран снижается из-за политики борьбы против табака. Рак легких у женщин также более распространен в развитых странах и связан с курением сигарет [9]. Во всем мире заболеваемость раком легких у женщин растет. Так, заболеваемость раком легких у женщин в Европе росла в течение большей части XXI века и в 2017 году впервые превысила показатели смертности от рака молочной железы - 14,6 случаев смерти от рака легких на 100 000 по сравнению с 14 на 100 000 случаев рака молочной железы [10]. В некоторых регионах, особенно в Азии, загрязнение воздуха внутри помещений и профессиональное облучение играют большую роль в раке легких у

женщин. Как и в США, в регионах наблюдаются значительные географические и этнические различия в заболеваемости и смертности от рака легких. В странах с более высоким уровнем дохода показатели выживаемости сравнительно улучшились, чем в странах с низким уровнем дохода [9]. Особую обеспокоенность в будущем вызывает недавний рост потребления сигарет в таких странах, как Китай, где 65% мужчин начинают курить в возрасте до 20 лет, предвидя эпидемию рака легких в ближайшие несколько десятилетий.

Пожилой возраст связан с развитием рака из-за биологических факторов, которые включают повреждение ДНК с течением времени и укорочение теломер. Соответственно, средний возраст диагностики рака легких составляет 70 лет для мужчин и женщин. Приблизительно 53% случаев встречаются у лиц в возрасте от 55 до 74 лет, а 37% - старше 75 лет. Самый высокий уровень заболеваемости раком легких у мужчин составляет 585,9 на 100 000 в возрасте 85–89 лет, тогда как самый высокий уровень заболеваемости у женщин составляет 365,8 на 100 000 в возрасте 75–79 лет [9]. Рак легких является основной причиной смерти среди мужчин старше 40 лет и у женщин старше 59 лет [11].

Тем не менее, рак легких наблюдается у очень молодых людей. Десять процентов случаев встречаются у пациентов младше 55 лет. Исследования немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) у пациентов в возрасте 20–46 лет показали, что молодые пациенты с раком легкого более склонны быть женщинами, иметь гистологию adenокарциномы, не курить и представлять более позднюю стадию заболевания. У молодых пациентов обычно наблюдается небольшое количество сопутствующих заболеваний, и считается, что генетические факторы играют большую роль в этой популяции пациентов. Более молодые пациенты с большей вероятностью получают более агрессивное лечение на всех стадиях заболевания и имеют улучшенную выживаемость на каждой стадии, хотя этот предел очень мал для прогрессирующего заболевания [12].

Самыми распространёнными типами немелкоклеточного рака лёгкого являются: adenокарцинома, плоскоклеточная карцинома, нейроэндокринные опухоли (включают три подтипа: немелкоклеточный рак легкого,

крупноклеточная нейроэндокринная карцинома (LCNEC) и карциноидная опухоль (типичная / атипичная) [13].

Аденокарцинома легкого является наиболее распространенным первичным раком легкого. Он связан с предшествующим курением. Хотя заболеваемость и смертность снизились, она остается основной причиной смерти от рака в Соединенных Штатах. Аденокарцинома легкого обычно развивается из слизистых желез и составляет около 40% всех случаев рака легких. Это самый распространенный подтип, который нужно диагностировать у людей, которые никогда не курили. Аденокарцинома легкого обычно возникает на периферии легкого, и во многих случаях может быть обнаружена в рубцах или областях хронического воспаления [14].

Плоскоклеточная карцинома (SCC) - это инвазивное злокачественное эпителиальное образование, которое возникает из слоев колено-сквамозных клеток эпидермиса и демонстрирует кератиноцитарную дифференцировку. Он способен метастазировать в регионарные лимфатические узлы и потенциально смертелен. SCC был первым отличием от базально-клеточного рака в 1902 году Компичером. Термины «плоскоклеточная эпителиома», «эпидермоидная карцинома», «эпителиома спиноцеллюлярная», «эпителиома колючей клетки» и «спиналиома» использовались в литературе, но «плоскоклеточный рак »является предпочтительной терминологией. Пациенты с прогрессирующим заболеванием могут страдать от осложнений неконтролируемой секреции гормонов и обычно поддаются смертельным осложнениям, вызванным секреируемыми гормонами, но в основном из-за прогрессирования опухоли [15].

Нейроэндокринные опухоли (NET) представляют собой новообразования, происходящие из гормон-продуцирующих клеток эндокринной системы, которая представляет собой комбинацию гормон-продуцирующих эндокринных и нервных клеток, как правило, из нервного гребня, нейроэндокринных островков и стволовых клеток. NET может проявлять функциональные и нефункциональные симптомы и представлять гетерогенную группу новообразований, таких как множественная эндокринная неоплазия (MEN), медуллярный рак щитовидной

железы 1 и 2 типа, феохромоцитомы / параганглиомы [16], гастроэнтеропанкреатические сети (GEP-NETs) и островковые клетки, слабодифференцированные / мелкоклеточные / атипичные карциноиды легкого [17].

Для мелкоклеточного рака характерны: мелкие размеры, обширное и раннее метастазирование, продукция гормонов, наличие специфических биомаркеров, быстрый рост, отсутствие дифференцировки.

1.2 Канцерогенез

Канцерогенез в легких – это сложный, поэтапный процесс, который включает в себя приобретение генетических мутаций и эпигенетических изменений, которые изменяют клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференцировка, инвазия и метастазирование. Огромную роль в развитии рака легкого играют воспаление, «области канцернации» и стволовые клетки рака легкого как инициаторы заболевания [18].

Модель развития и развития опухолевых стволовых клеток (CSC) относится к наличию популяции редких клеток в опухоли, обладающих свойствами стволовых клеток. Они способны к самообновлению и дифференциации в свое потомство. Способность CSC к самообновлению отвечает за поддержание роста опухоли в течение неопределенного времени. Другие клетки, составляющие основную часть опухоли, активно пролиферируют и дифференцируются и поэтому чувствительны к современной традиционной терапии рака. CSC считаются клетками, инициирующими опухоль. Установили, что CSC не обязательно являются редкими клетками в опухоли. Вместо этого CSC может представлять собой редкую стволовую клетку, клетку-предшественник или дифференцированную клетку, у которой развивается способность к самообновлению. Предполагается, что эти клетки, инициирующие опухоль, происходят из клеток, которые не регулируют репарацию, что приводит к неопределенному самовосстановлению. Они связаны с рецидивом и плохим

прогнозом, по-видимому, из-за устойчивости к химиотерапии и лучевой терапии [19]. Вклад CSCs в устойчивость к опухолям хорошо согласуется с естественным анамнезом рака легких, который характеризуется высокой частотой возникновения рецидивов и метастазирования, приводящих к самой высокой смертности от всех видов рака. Классическая проверка популяции клеток, инициирующих опухоль CSC, включает в себя моделирование опухоли человека у мышей с иммунодефицитом с последующей неопределенной последовательной ксенотрансплантацей CSC [19].

Хроническое воспаление во многих участках органов повышает риск развития рака до такой степени, что воспаление в настоящее время считается «седьмым признаком рака». Связь между воспалением и канцерогенезом в легких хорошо установлена. Сигаретный дым, в частности, является мощным индуктором воспаления легких и играет ключевую роль в канцерогенезе легких [20]. В дыхательных путях наблюдаются некоторые изменения, связанные с хроническим воспалением, включая изменения в цитокинах, хемокинах и факторах роста, выделяемых альвеолярными макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами, эндотелиальными клетками и фибробластами. Воспаление дыхательных путей направлено на повреждение эпителия, что дополнительно ведет к аномальному воспалительному ответу [21].

Есть две гипотезы гистогенеза мелкоклеточного рака лёгкого:

1) Рак лёгкого развивается из клеток диффузной эндокринной системы. Сторонники объясняют свою гипотезу обнаружением в элементах мелкоклеточного рака дыхательных путей обнаруживаются морфологических структур, таких как нейроэндокринные гранулы размерами от 50 до 500 нм и биохимических маркеров, свойственных клеточным элементам APUD-системы, а их происхождение связывают с невральным гребешком. В бронхиальных железах, крупных бронхах и бронхиолах у человека доказано наличие таких клеток. На основе этих данных получило широкое распространение мнение о том, что мелкоклеточный рак трахеи относится к опухолям APUD-системы и выступает как агрессивный вид злокачественного карциноида. Также при этом

утверждается: лишь клеткам-производным неврального гребешка свойственна нейроэндокринная дифференцировка [22].

2) Вторая гипотеза заключается в представлении, что рак лёгкого возникает из клеток бронхиальной выстилки, имеющих энтодермальное происхождение. Сторонники же этой гипотезы считают, что мелкоклеточный рак трахеи, также, как и другие гистологические типы, имеет энтодермальное происхождение. В подтверждение этой гипотезы выдвигают наличие общих признаков в элементах всех гистологических типах мелкоклеточного рака лёгкого, а также отличием мелкоклеточного рака трахеи от других нейроэндокринных новообразований. Имеются экспериментальные данные о том, что признаки нейроэндокринной дифференцировки могут быть присущи и клеточным элементам, имеющим энтодермальное происхождение [22].

В последние годы экспериментально показано, что ранее энтерохромаффинные клетки желудочно-кишечного тракта (островковые клетки поджелудочной железы) рассматривали как производные нейроэктодермы, но в последние годы экспериментально показано, что они на самом деле имеют общее происхождение с другими эпителиальными элементами этих систем – энтодермальное [22].

На данный момент не принято считать APUD-клетки желудочно-кишечного тракта производными неврального гребешка. Нет убедительных данных, показывающих миграцию клеток неврального гребешка в трахею. Однако, нейроэндокринные гранулы нередко обнаружаются в слизепродуцирующих клетках нормальной бронхиальной выстилки. Но нельзя полностью отрицать возможность миграции в трахею элементов нейроэктодермы, так как развитие в трахее меланомы свидетельствует в пользу этого [22].

Крупноклеточный рак включает в себя светлоклеточный, гигантоклеточный и солидный рак. Возникает из нейроэндокринных клеток выстилки дыхательных путей, либо из гладкомышечных элементов их стенки [2].

1.3 Квантовые точки

Коллоидные квантовые точки – полупроводниковые нанокристаллы с размером в диапазоне 2-10 нанометров, состоящие из 103 - 105 атомов, созданные на основе неорганических полупроводниковых материалов Si, InP, CdSe и т.д., покрытые монослоем стабилизатора. Квантовые точки по своим размерам больше традиционных для химии молекулярных кластеров (~ 1 нм при содержании не больше 100 атомов). Коллоидные квантовые точки объединяют физические и химические свойства молекул с оптоэлектронными свойствами полупроводников [23].

Квантовые точки имеют размеры и число атомов между атомно-молекулярным уровнем и объемным материалом с шириной запрещенной зоны, которая сложным образом зависит от ряда факторов, включая тип связи и прочность с ближайшими соседями. Для изолированных атомов наблюдаются острые и узкие люминесцентные эмиссионные пики. Однако наночастица, состоящая примерно из 100–10000 атомов, имеет четкие узкие оптические спектры. Вот почему квантовые точки часто описываются как искусственные атомы [24]. Значительный объем текущих исследований направлен на использование уникальных оптических свойств квантовых точек в устройствах, таких как светоизлучающие устройства (LED), солнечные элементы и биологические маркеры. Наиболее захватывающим изменением квантовых точек с размером частиц $<\sim 30$ нм являются резкие различия в оптическом поглощении, энергии экситонов и рекомбинации электронно-дырочных пар. Использование этих свойств квантовых точек требует достаточного контроля во время их синтеза, потому что их внутренние свойства определяются различными факторами, такими как размер, форма, дефект, примеси и кристалличность. Зависимость от размера возникает из-за, во-первых, изменения отношения поверхности к объему с размером и, во-вторых, квантовых эффектов удержания. Тем не менее, квантовые точки проявляют различный цвет излучения с изменением размера [25].

В 1998 году Аливисатос и его группа показали, что квантовые точки могут быть потенциальными кандидатами для биологического применения [26]. Чтобы

установить применение квантовых точек, биотин был ковалентно связан с поверхностью квантовых точек и использовался для маркировки фибробластов, которые инкубировали в фаллоидин-биотине и стрептавидине [25].

С практической точки зрения важные оптические диапазоны - видимый 400-750 нм [23].

Энергетический спектр квантовой точки зависит от ее размера. Аналогично переходу между уровнями энергии в атоме, при переходе носителей заряда между энергетическими уровнями в квантовой точке может излучаться или поглощаться фотон. Частотами переходов, т.е. длиной волны поглощения или люминесценции, можно управлять, меняя размеры квантовых точек [23].

Окраска квантовой точки зависит от ее размера: чем больше, тем ближе к красному спектру флуоресценции, а чем ниже – тем ближе к синему [27].

Создание флуоресцентных меток на основе квантовых точек весьма перспективно. Можно выделить следующие преимущества квантовых точек перед органическими красителями: возможность контроля длины волны люминесценции (ширина запрещённой ямы зависит, которая определяет энергию, а, следовательно, цвет флуоресцентного света, обратно пропорциональна размеру квантовой точки [27], высокий коэффициент экстинкции, растворимость в широком диапазоне растворителей, стабильность люминесценции к действию окружающей среды, высокая фотостабильность. Также можно отметить возможность химической (или более того биологической) модификации поверхности квантовых точек, позволяющей осуществить селективное связывание с биологическим и объектами [28].

КТ используемые в био-применениях – исключительно коллоидные нанокристаллы. Самые лучшие доступные квантовых для биологического применения изготавливаются из пленок CdSe ядра покрыта слоем ZnS, потому что это химия-самая изощренная. Слой ZnS пассивирует поверхность ядра, защищает ее от окисления, предотвращает просачивание Cd / Se в окружающий раствор, а также обеспечивает существенное улучшение выхода PL. Несмотря на то, что тонкие оболочки ZnS (1-2 монослоя) часто дают самые высокие выходы PL, более

толстые оболочки ZnS (4-6 монослоев) обеспечивают большую защиту ядра от окисления и более жестких условий, представленных биологическими средами (например, кислотными буферами и клеточными органеллами). Были приготовлены коллоидные КТ из ZnS, CdS, ZnSe, CdTe и PbSe, излучающие от УФ до инфракрасного диапазона [28].

1.4 Гибриды квантовых точек и биологических молекул

Гибриды квантовых точек и биологических молекул. Гибриды неорганические-биологические гибриды получают путем конъюгирования неорганических наноструктур (наночастиц, наностержней) с биомолекулами (белками, ДНК) и полученные конъюгаты объединяют свойства обоих материалов, то есть спектроскопические характеристики нанокристалла и биомолекулярную функцию поверхностно-присоединенных образований. Благодаря своему конечному размеру (сравнимому или немного большему, чем у многих белков, одна КТ может быть конъюгирована с несколькими белками одновременно. КТ таким образом действует как nanoscaffold для приложения нескольких протеинов, или других биомолекул, создавая многофункциональный гибрид. Показано, что ~15-20 мальтозосвязывающих белков (МВР, Mr ~ 44 КДА) могут быть присоединены к каждому КТ диаметром 6 нм [29]. Схемы конъюгации для присоединения белков к КТ можно разделить на три категории, каждая из которых имеет ограничения. 1) использование EDC, 1-этил-3- (3-диметиламинопропил) карбодииамида, конденсация для реакции карбоксильных групп на поверхности QD с аминами; 2) прямое связывание с поверхностью КТ с использованием тиолированных пептидов или остатков полигистидина (HIS); 3) адсорбция или нековалентная самосборка с использованием инженерных белков [28].

КТ имеют большую двухфотонную эффективность поперечного сечения с двухфотонным процессом флуоресценции. Это делает их пригодными для визуализации глубоких тканей *in vivo* с использованием двухфотонного

возбуждения при низких интенсивностях. Использование этой методики для возбуждения зеленого излучения КТ в ближнем инфракрасном диапазоне позволило визуализировать мышиные капилляры глубиной в сотни микрометров и субклеточным разрешением мозга мышей [28].

КТ также может быть полезен для отслеживания раковых клеток *in vivo* во время метастазирования. Исследователями был разработан многофункциональный зонд QD46, связанный с антителами, нацеленными на опухоль. Исследования *in vivo* на мышах, экспрессирующих рак человека, показали, что эти КТ-зонды накапливаются в местах опухоли [28].

Ряд исследователей использовал в качестве направляющих агентов КТ аптамеры. Так, в одном исследовании было показано, что использование аптамеров в качестве направляющего агента для визуализации клеток опухоли простаты с помощью КТ так же эффективно, как использование конъюгатов КТ с анти-PSMA-антителами, но значительно дешевле [30].

На данный момент в большинстве биологических исследованиях применяются CdSe/ZnS-частицы, окруженные полимерной или силиконовой оболочкой. Схема современной квантовой точки представлена на рисунке 1. Такие КТ гораздо стабильнее своих предшественников, покрытых лишь небольшими лигандами. Проявляют токсичность только в экстремальных условиях или при концентрациях, во много превышающих необходимую для визуализации и окрашивания мишней. Важно учитывать, что т.к. КТ – наночастицы, то важным для проявления их токсичности является не состав, а физико-химические свойства поверхности. Квантовые точки для молекуллярной диагностики опухолей [5].

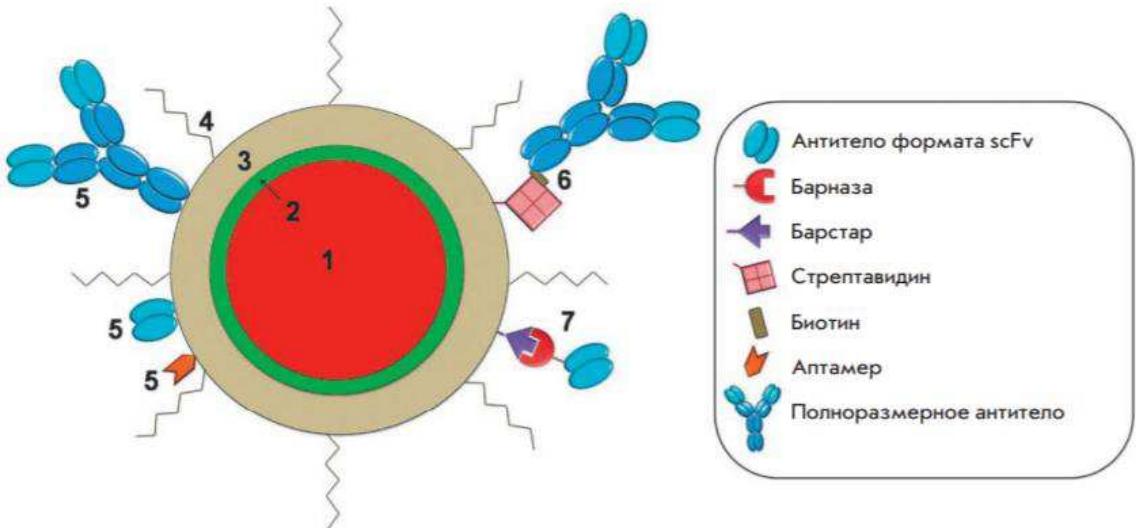


Рисунок 1. Схема строения современной квантовой точки для биомедицинских исследований. 1 – флуоресцентное ядро (обычно, CdSe или CdTe); 2 – защитная оболочка (обычно, ZnS); 3- полимерное покрытие, обеспечивающее водорастворимость КТ и возможность присоединения биологически активных молекул; 4 – молекулы ПЭГ, 5 – направляющие молекулы, присоединённые напрямую и через системы адапторов биотин-стрептавидин или барназа-барстар [5].

1.5 Аптамеры

Нуклеиновые кислоты могут формировать сложные формы, способные служить основой для молекулярных взаимодействий и образования комплексов с различными соединениями. Синтетические аптамеры нуклеиновых кислот представляют собой уникальный класс высокоаффинных лигандов. Они продемонстрировали потенциал в различных областях применения – от терапии, адресной доставки лекарств, сенсоров, до диагностических реагентов [31]. В отличие от биологических процессов, используемых для идентификации белковых лигандов, аптамеры синтезируются химически и, таким образом, эволюция *in vitro* может быть использована для их разработки и оптимизации [32]. Методы синтеза ДНК позволили генерировать большие популяции вырожденных олигодезоксикислот. В тоже время ПЦР позволяет увеличить небольшое

количество молекул до значений, которыми может манипулировать исследователь.

Одноцепочечная РНК складывается в обширный набор третичных структур в зависимости от их различных первичных структур. Следовательно, РНК-аптамеры обладают высоким потенциалом действия как молекулярные имитаторы белков. Эта концепция возникла в исследованиях механизма трансляции, в котором обнаружили, что фактор высвобождения полипептида кодирует трипептидный антикодон в качестве молекулярного имитатора антикодона тРНК [33]. Структурная гибкость и молекулярная мимикрия одноцепочечного полинуклеотида способствовали разработке на основе аптамеров модуляторов биологических процессов, например, для терапевтического применения.

Аптамеры предпочитают взаимодействовать с положительно заряженными поверхностями белков-мишеней из-за отрицательно заряженной природы основных связей. Например, кристаллические структуры аптамеров в комплексе с белками-мишениями, такими как структуры ядерного фактора (NF)- κ B, капсида бактериофага MS2 и тромбина, продемонстрировали электростатические взаимодействия. Домен, связывающий нуклеиновую кислоту белка NF- κ B и MS2, создает поверхности взаимодействия для аптамеров. Тромбин связывается с аптамером через положительно заряженную поверхность, которая, естественно, необходима для связывания гепарина [34]. В совокупности кристаллические структуры показали, что электростатические силы являются одними из наиболее распространенных источников высокого сродства между аптамером и мишенью. А факт, что комплементарность формы может обеспечить значительное сродство, указывает на то, что аптамерная технология применима не только для положительно заряженных молекул, но также и для относительно нейтральных молекул.

Конформационное разнообразие и направленная специфичность РНК-аптамеров обеспечивают многообещающий потенциал для их терапевтического применения в качестве ингибиторов межбелковых взаимодействий. Для

достижения этой цели требуется несколько функций аптамера. Во-первых, терапевтические аптамеры должны быть очень стабильными в организме. Так как природные РНК и ДНК чувствительны к эндогенным нуклеазам, химические модификации в сахарном и / или фосфодиэфирном остеове должны быть адекватно включены. Во-вторых, длина нуклеотида должна быть достаточно укорочена. Усечение аптамера уменьшит стоимость производства лекарств, облегчит обеспечение качества материала и предотвратит неожиданную токсичность. В-третьих, терапевтические аптамеры должны обладать хорошей фармакокинетикой, как многие другие лекарства [35].

Аптамеры получают направленным отбором *in vitro* из библиотек олигонуклеотидов. Метод получил название SELEX (от англ. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении) [36]. Метод был разработан в 1990 году и продемонстрировал способность аптамеров связывать широкий спектр целевых молекул, начиная от больших белков до маленьких молекул [32]. Принцип данного метода изображён на 0. Перед отбором синтезируется библиотека олигонуклеотидов, которая обычно содержит до 10^{15} различных уникальных последовательностей. Каждая уникальная последовательность содержит случайные основания (20–50 нт), фланкированные двумя консервативными сайтами связывания праймеров, которые используются для ПЦР-амплификации путем отжига праймеров. На этапе отбора библиотеку инкубируют с молекулами-мишенями в течение указанного времени. После инкубации несвязанные последовательности отделяют от тех, которые связаны разными способами. Связанные с мишенью последовательности амплифицируют с помощью ПЦР (ДНК SELEX) или ПЦР с обратной транскрипцией (РНК SELEX). Продукты ПЦР, являясь новым подпулом, используются для следующего раунда отбора. После нескольких раундов отбора, обогащенные последовательности секвенируются, и их способности к связыванию дополнительно оцениваются. Как правило, получение конкретных аптамеров занимает от нескольких недель до нескольких месяцев. Таким образом, получение высококачественных аптамеров для

соответствующих целей все еще остается сложной темой. Чтобы сократить время отбора и увеличить качество, было разработано несколько модифицированных методов SELEX [37]. Проведение многочисленных экспериментов по отбору *in vitro* показало, что аптамеры могут быть получены практически к любым мишениям: белкам, пептидам, нуклеиновым кислотам, полисахаридам, малым органическим молекулам (аминокислотам, нуклеотидам и другим метаболитам), вирусным частицам, целым клеткам и даже тканям [38].

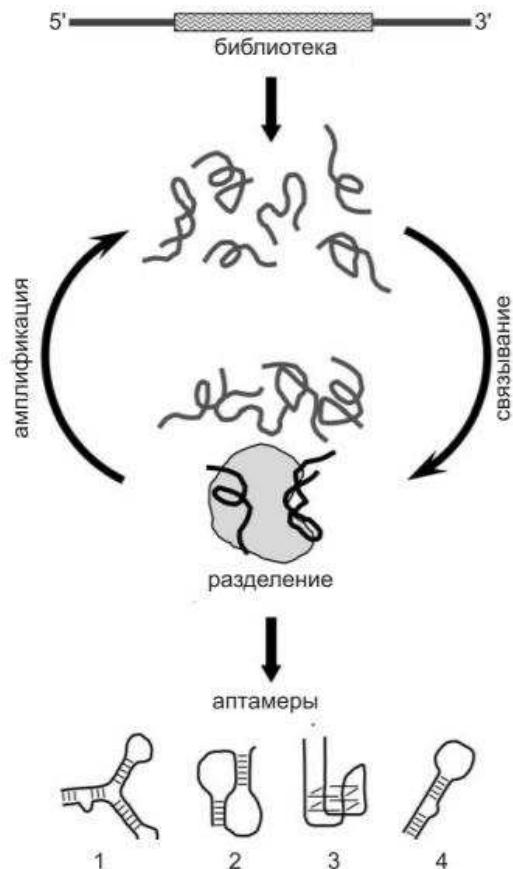


Рисунок 2. Схематичное изображение принципа SELEX.

Модификации для SELEX представлены такими как негативный SELEX, Counter SELEX, Capillary Electrophoresis SELEX, микрофлюидный SELEX [39].

Негативный SELEX разработали Эллингтон и Шостак в 1992 году. После трех циклов отбора они инкубировали библиотеку с агарозой для очистки в качестве отрицательного отбора. Последовательности неспецифического связывания удаляли из каждого пула, средство полученных аптамеров было примерно в 10 раз выше, чем без отрицательного отбора [39].

По сравнению с традиционным SELEX, Counter SELEX добавляет дополнительный этап, используя структурно-подобные мишени для инкубации с аптамерами для эффективной дискриминации неспецифических олигонуклеотидов [39].

В 2004 году был разработан модифицированный метод SELEX под названием капиллярный электрофорез SELEX (CE-SELEX) [36]. CE-SELEX отделяет целевые ограниченные последовательности от несвязанных последовательностей по разнице в электрофоретической подвижности, которая является высокоэффективным методом разделения. Этот метод позволяет выбирать кандидатов на аптамеры с высокой аффинностью, в то же время сокращая количество раундов отбора с 20 (обычный SELEX) до 1–4.

В 2006 году был разработан микрофлюидный прототип SELEX (M-SELEX), посредством объединения традиционного SELEX с микрофлюидной системой. Прототип содержал загруженные реагентом микропровода, коллектор резервуара для реагента под давлением, термоциклер для ПЦР и приводные клапаны для отбора и распределения проб. Используя это устройство, успешно получили РНК-аптамер к лизоциму. В 2009 году была описана более эффективная, быстрая и автоматическая система отбора аптамеров [40]. Эта система объединяет процесс SELEX на основе магнитных шариков с технологией микрофлюидики и сепаратором на основе магнитно-активируемого чипа с непрерывным потоком. Только после одного раунда отбора был получен обогащенный пул аптамеров, который мог связываться с рекомбинантным нейротоксином ботулина типа А с высокой аффинностью [37].

Аптамеры являются высокоаффинными и очень специфичными лигандами. Аптамеры к белкам часто связываются в функционально важных участках молекулы и являются ингибиторами активности белков-мишеней. По большинству своих характеристик аптамеры не уступают моноклональным антителам и могут быть использованы вместо антител во многих экспериментах. В то же время аптамеры обладают значительно большей стабильностью, чем антитела. Метод отбора аптамеров достаточно прост и позволяет получать новые

лиганды в течение всего одного-двух месяцев. В последнее время разработаны методов автоматического отбора аптамеров, которые позволяют проводить одновременный отбор аптамеров к большому числу различных мишеней [38].

Олигонуклеотиды для создания аптамеров легко синтезируются, используя твердофазную химию фосфорамидита. Этот процесс автоматизирован и в малых масштабах (до 100 нуклеотидов) и в крупных, которые содержат широкий диапазон модификаций. Эти модификации включают фосфоротиоат межнуклеотидные связи; недезоксирибозные сахара такие как рибоза, 2'-фтор-рибоза и 2'-О-метил-рибоза; а также олигонуклеотидные концевые капсулы, например, холестерина [36].

Кроме того, химический синтез позволяет внедрять сайт ненуклеотидных линкеров (таких как гексаэтиленгликоль), введение химических функциональных групп, полезных для конъюгации, таких, как первичные амины (предшественники тиолови предшественники альдегидов) и добавление флуоресцентногоили других репортерных групп. В частности, сайт-специфическое размещение функциональных групп для конъюгации означает, что модификация аптамеров после твердофазной стадии (например, с высокой молекулярной массой PEG46 приводит к продуктам с дискретной стехиометрией иопределенных химических структур. Эти изменения избегают потери активности, которые часто наблюдаются у стохастически-модифицированных терапевтических белковых конъюгатов [36].

Очистка аптамеров также проста, благодаря денатурации при повышенной температуре или воздействию хаотропных агентов. Эти факты ставят аптамеры в более выгодное положение, чем антитела [41].

Аптамеры эффективно связываются с молекулами-мишениями, они более чувствительны, чем антитела, и в отличие от них могут быть использованы против неиммуногенных и токсических веществ.

Аптамеры в 10-100 раз меньше антител и на поверхности биосенсоров их можно расположить с большей плотностью. Такие биосенсоры не потеряют чувствительность, поэтому возможно их повторное использование [36].

Аптамеры не дорогие, не иммуногенные и легко модифицируются. Аптамеры ингибируют целевые ферменты путем связывания с каталитическим центром или индуцирования изменений конформации в структуре белка. Однако, когда аптамер похож на активирующий лиганд, он может индуцировать активацию фермента [36].

Аптамеры можно конъюгировать с лекарственными средствами для целенаправленной доставки лекарств. Так, возможно доставлять токсичные и радиоактивные вещества, эти вещества будут концентрироваться локально. К тому же аптамеры могут доставлять легко разлагаемые или легко выделяемые вещества [36].

На моделях животных продемонстрирована низкая эффективность противоопухолевых антител в адресной доставке наночастиц. Конъюгаты таких размеров удаляются из кровотока фагоцитами. Конъюгаты наночастиц с аптамерами имеют меньший размер и демонстрируют эффективное проникновение в ткани [36].

С использованием аптамеров связан ряд проблем, одной из основных выступает быстрая деградация аптамеров нуклеазами. В крови распад колеблется, в зависимости от концентрации и конформационной структуры, от нескольких минут до десятков минут. Столь короткий временной интервал не позволяет эффективно использовать аптамеры, в связи чем разработано несколько способов защиты от нуклеаз [36].

Традиционным методом выступает выполнение SELEX с олигонуклеотидами, содержащими модифицированные нуклеотиды. Такие олигонуклеотиды получают, используя специальные полимеразы, которые способны использовать субстраты нуклеозидтрифосфата с модифицированным, например, 2'-сахаром. К тому же, модификация нуклеотидов можно выполнить после SELEX, но включение дополнительных функциональных групп в таком случае может влиять на специфичность и сродство аптамера. Наиболее эффективным улучшением является модификация 3'- и 5'-нуклеотидов. Очень устойчивы к деградации нуклеазами замкнутые кольцевые структуры,

возникающие после лигирования 3'- и 5'-концов одного и того же аптамера. Несколько различных аптамеров также могут быть лигированы в замкнутую структуру с множественными специфическими свойствами, поскольку продукты разложения некоторых модифицированных олигонуклеотидов могут быть токсичными [36].

Ещё один метод – скрининг смещения аптамеров. Метод основан на скрининге низкомолекулярных веществ в соответствии с их способностью вытеснять аптамеры из сайта связывания молекула-мишень. Этот метод основан на скрининге низкомолекулярных веществ в соответствии с их способностью вытеснять аптамеры из сайта связывания молекула-мишень. Предполагается, что выбранное вещество будет иметь специфичность и сродство, аналогичное таковым у перемещенного аптамера. Ингибирующее действие этих низкомолекулярных соединений на белковые мишени часто идентично эффекту аптамеров [36].

Другим методом выступает применение поликатионных биополимеров, которые эффективно связывают полианионные олигонуклеотидные молекулы [36].

Индуцированная активация – преобразование аптамера из неактивной формы в активную. Например, неактивный аптамер, содержащий нуклеотиды с особыми светочувствительными модификациями, не связывает молекулу-мишень. После воздействия света с определенной длиной волны аптамер теряет свои фоточувствительные группы и превращается в функционально активное состояние. Данный подход позволяет контролировать время и место активации аптамера [36].

1.6 АФК

Активные формы кислорода (АФК), такие как супероксидный анион (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал ($HO\cdot$), состоят из радикальных и нерадикальных форм кислорода, образующихся при частичном

восстановлении кислорода. Клеточные АФК образуются эндогенно, как в процессе митохондриального окислительного фосфорилирования, или могут возникать в результате взаимодействия с экзогенными источниками, такими как ксенобиотические соединения. Когда АФК подавляют клеточную систему антиоксидантной защиты, будь то через повышение уровня АФК или снижение клеточной антиоксидантной способности, возникает окислительный стресс. Окислительный стресс приводит к прямому или косвенному АФК-опосредованному повреждению нуклеиновых кислот, белков и липидов и участвует в канцерогенезе, нейродегенерации, атеросклерозе, диабете и старении. Однако участие АФК в патогенезе патологических состояний не ограничивается только повреждением макромолекул. Существует все больше свидетельств того, что сигнализация АФК способствует развитию болезни. Например, было показано, что АФК способствуют метастазированию опухоли через активацию генов [42].

Основное состояние триплетного молекулярного кислорода представляет собой биорадикал с двумя внешними валентными электронами, занимающими отдельные орбитали с параллельными спинами. Чтобы окислить нерадикальный атом или молекулу, триплетный кислород должен реагировать с партнером, который обеспечивает пару электронов параллельными спинами, которые вписываются в его орбитали свободных электронов. Однако пары электронов обычно имеют противоположные спины и, к счастью, накладывают ограничение на реакцию триплетного молекулярного кислорода с большинством органических молекул. Однако кислород в основном состоянии может быть превращен в гораздо более реакционноспособные формы АФК либо путем передачи энергии, либо посредством реакций переноса электрона. Первое приводит к образованию синглетного кислорода, а второе приводит к последовательному восстановлению до супероксида, пероксида водорода и гидроксильного радикала [43].

Образование свободных радикалов, инициирующих свободнорадикальное цепное окисление возможно при действии токсических соединений, некоторых антибиотиков и ксенобиотиков, при фотохимическом воздействии, например, УФ

– облучении изолированных мембран клеток и кожи животных и человека, при облучении этих объектов в присутствии сенсибилизаторов, т.к. фурокуморины используются при терапии кожных заболеваний [44].

Возможна постишемическая активация перекисного окисления липидов, приводящая к нарушению функций различных органов, чаще мозга (после реанимации) и сердца (после инфаркта). К тому же, супероксидный радикал продуцируется появлением субстрата ксантиоксиназы при гипоксии или нарушении обмена веществ, фаготиращими клетками макрофагами и моноцитами крови, и тканевыми макрофагами. Сами перекиси, образующиеся при ПОЛ, чаще не являются первопричиной появления патологий в организме. Перекиси липидов являются интермедиатами, которые используются организмом для синтеза биологически активных веществ – простогландинов, тромбоксанов, стероидных гормонов и т.д. Поэтому их нельзя рассматривать как нежелательные продукты окисления. Предполагают, что этому способствуют продукты глубокого окисления (альдегиды, кетоны, кислоты и т.д.) [44].

При патологических процессах источником может быть NADPH-оксидаза, а также ксантинооксидаза-фермент, продуцирующий при окислении ксантина и гипоксантина [44].

Влияние окислителей на клетки приводит к широкому спектру клеточных ответов: пролиферация, дифференцировка, миграция и гибель клеток. Конкретный ответ зависит от типа клеток, места внутриклеточной генерации, вида АФК, а также дозы и длительности действия. Низкий уровень способствует пролиферации и дифференциации. Большее количество приводит к прекращению деления клетки, а дальнейшее увеличение количества приводит к гибели клетки. Так, АФК, в зависимости от длительности воздействия и уровня, влияют на дифференциацию эмбриональных клеток: продолжительное воздействие АФК приводит к угнетению кардиомио- и васкулогенеза, в то время как импульсное воздействие невысокими дозами АФК усиливает дифференциацию в кардиомиоциты, а также образование сосудов (взгляд клинициста). Доказано и влияние АФК на дифференциацию нейронов: клетки с низким уровнем АФК

дифференцировались в олигодендроциты и астроциты, а с более высоким затем – в большие пирамидальные и мелкие нейроны [44].

АФК, как индукторы пролиферации, участвуют в активации митогенных сигнальных путей. различные факторы роста с митогенной активностью, такие как PDGF, FGF2 и EGF активируют МАР-киназные митогенные пути, в которых АФК, генерируемые НАДФ•Н-оксидазой, являются необходимым компонентом. [45]. Ингибирование этого фермента приводит к снижению уровня АФК и, в зависимости от дозы, блокированию EGF и PDGF-индуцированной пролиферации клеток лейомиомы [44].

Рост АФК может приводить к остановке деления клетки (клеточный арест). Этот процесс может возникать из-за умеренного повреждения клеток [44].

АФК влияют на иммунные процессы. Они участвуют в активации Т-лимфоцитов, что сопровождается дифференцировкой, пролиферацией и секрецией цитокинов [44].

АФК принимают участие в регуляции сосудистого тонуса, способствуя дифференциации кровоснабжения, следовательно, доступности кислорода в тканях. Основными источниками АФК почти во всех клетках сосудистой стенки и кардиомицетах выступают изоформы НАДФ•Н-оксидазы. Этот ферментный комплекс активируется за счёт различных факторов, таких как гормоны роста, цитокины, а также гемодинамические и метаболические изменения. Действие гормонов и факторов роста опосредовано мембранными рецепторами, а гемодинамические и метаболические изменения непосредственно приводят к активации НАДФ•Н-оксидазы и образованию АФК. Такая особенность образования АФК в сосудистой системе позволяет рассматривать их как элемент единой реакции и модулятор сигнальных путей [45].

Двухвалентный катион кадмия является сильным цитотоксическим и генотоксическим агентом высокой экологической и профессиональной опасности. Существует достаточно доказательств того, что Cd^{2+} вызывает апоптотическую гибель клеток, хотя при определенных условиях наблюдался и неапоптотический распад клеток [46]. Цитотоксические эффекты Cd^{2+} в

различных клеточных линиях связаны с окислительным стрессом. Были также накоплены доказательства того, что митохондрии, вероятно, являются одной из основных мишеней вредного действия Cd²⁺ внутри клетки [47].

2 Материалы и методы

2.1 Материалы и оборудование

В работе было использовано следующее оборудование:

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

В работе было использовано следующие материалы и реагенты:

- 1,7 мл эппендорфы
- 1,7 мл эппендорфы с фильтром Cutoff
- Дозаторы
- Чашки Петри
- Шприцы
- АФК-зависимый зонд, 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (Sigma-Aldrich)
- Диметилсульфоксид (DMSO)
- N-Hydroxysulfosuccinimide sodium / Sulfo-NHS
- 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, 98% / EDAC
- MQ (бидистиллярованная вода)
- Квантовые точки с –COOH группой
- NH₂-Праймер (AmPrCom5)
- Фосфатный буфер (PBS^(Ca²⁺, Mg²⁺))
- ДНК-аптамер LC18
- Диэтиловый эфир

2.2 Конъюгация квантовых точек с праймерами

Активация квантовых точек происходила с использованием реакционной смеси, содержащей 1 мг Sulfo-NHS, 0.5 мкл EDAC (98%) и 1 мл воды MQ. Смесь тщательно перемешивали и ставили в ультразвуковую ванну «Сапфир» на 10 мин. После этого добавляли 3 мкл квантовые точки (КТ), модифицированные карбоксильными группами, и 100 мкл 10 мкМ праймера. Реакционную смесь инкубировали в Multi-Vortex в течение 2-х часов.

Через 2 часа квантовые точки, конъюгированные с праймером, отделяли от свободных праймеров и реагентов. Очистку КТ проводили с помощью cutoff фильтра (эплендорф №1). Эплендорф с cutoff фильтром помещали в центрифугу на 15 мин с максимальной скоростью 14,3 тыс. об./мин.

Осаждённые на фильтре КТ промывали фосфатным буфером и сливало в чистый эплендорф (эплендорф №2). Оценку связывания квантовых точек с праймером осуществляли с помощью системы гель-документирования GBOX Syngene (Рисунок 3).

Появление флуоресценции в одном эплендорфе с квантовыми точками свидетельствовали о том, что праймеры, конъюгированные с квантовыми точками не проходили через фильтр. Несвязанные праймеры фильтровались и оставались в эплендорфе №1.

К конъюгатам квантовых точек с праймером добавляли в эквимолярном количестве аптамер LC18 к раку легкого. Смесь инкубировали на Multi-Vortex в течение 30 мин.



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

2.3 Первичная оценка связывания препарата с послеоперационным материалом больного раком легкого

Для первичной оценки связывания препарата с клетками рака легкого использовали 3 мкл КТ. Ткань рака легкого забирали во время операции в стерильные пробирки объемом 15 мл с питательной средой, содержащей 5 мл холодного раствора Хэнкса (HBSS) с 10%-ным раствором антибиотиков и антимикотиков, у онкологического больного, находящегося в Красноярском краевом клиническом онкологическом диспансере им. А.И. Крыжановского. Забор материала осуществляли с одобрения этического комитета и с информированного согласия пациента. Ткань быстро доставляли на сухом льду в Лабораторию биомолекулярных и медицинских технологий Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого для дальнейшей работы.

В вытяжном шкафу избыток раствора Хэнкса в пробирке с тканью рака легкого удаляли пипеткой. После этого ткань промывали 3 раза 5 мл холодным PBS^(Ca²⁺, Mg²⁺) для удаления клеток крови. Затем ткань рака легкого переносили в

чашку Петри, заполненную 1 мл фосфатного буфера и удаляли некротические ткани и сгустки крови.

Опухолевую ткань разделяли на части с целью приготовления двух опытных проб. В первый эплендорф помещали кусочек ткани рака легкого, во второй – клетки, выделенные из ткани рака легкого. В обе пробирки добавляли коньюгат квантовых точек с аптамером LC18 и инкубировали 5 мин на Multi-Vortex. Далее пробы центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин, супернатант удаляли. Затем обе пробы отмывали центрифугированием в фосфатном буфере, супернатант удаляли. Эта процедура необходима для очистки опухолевых клеток и ткани, коньюгированных с комплексом «аптамер-праймер-КТ», от несвязавшихся комплексов. После удаления супернатанта в оба эплендорфа вновь добавляли фосфатный буфер и пробы перемешивали.

С помощью системы гель-документирования GBOX Syngene оценивали связывание образца рака легкого и выделенных из неё клеток с препаратом на основе аптамеров, коньюгированных с квантовыми точками, по флуоресценции. Флуоресценция наблюдалась в обеих пробах (Рисунок 4), что доказывало связывание комплекса «аптамер LC18-праймер-КТ» с образцом ткани рака легкого и с выделенными из нее опухолевыми клетками.

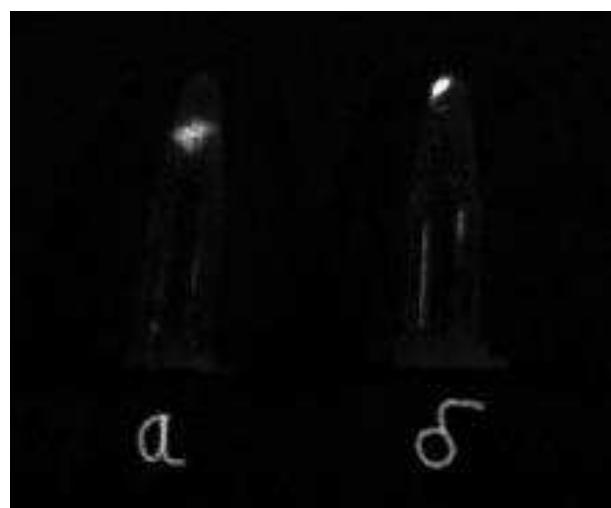


Рисунок 4 – Оценка связывания коньюгата квантовых точек аптамерами образцами рака легкого по флуоресценции: а) образец ткани; б) опухолевые клетки

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

Острую токсичность квантовых точек проводили путем изучения влияния однократного введения конъюгатов квантовых точек с аптамерами на животных *in vivo*. В эксперименте были использованы белые мыши ICR. Эксперименты проводили в соответствии с принципами и протоколами, предусматривающими гуманное отношение к лабораторным животным.

Эксперимент повторял основные этапы методики получения конъюгатов квантовых точек с аптамерами.

Перед этапом очистки квантовых точек изменяли соотношение веществ. Состав реакционной смеси: 1 мг Sulfo-NHS, 0,5 мкл EDAC (98%) и 1029 мкл MQ. Квантовые точки (КТ) с карбоксильными группами добавляли в объеме 15 мкл, а 10 мкМ NH₂-Праймер (AmPrCom5) – в объеме 116 мкл.

После очистки квантовых точек раствор разделяли по 570 мкл в 2 пробы. В первую пробу вносили 30 мкл ДНК-аптамера LC18 к раку легкого и инкубировали в течение 30 мин.

Общий объем коьюгата квантовых точек с аптамерами составлял 600 мкл. 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 вводили по 50 мкл исследуемого препарата.

Для изучения острой токсичности 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 вводили физиологический раствор. Мыши находились в стандартных условиях вивария, пища и воды были без ограничений.

2.5 Определение АФК методом микроскопии

Наблюдение эффекта исследуемого конъюгата аптамеров с КТ после введения осуществляли в течение 14 дней. На 15-ый день осуществляли изъятие печени, почек и легкого у мышей, наркотизированных диэтиловым эфиром. Органы опытных и контрольных мышей измельчали с помощью скальпеля в чашках Петри до превращения в суспензию клеток, которые затем инкубировали с флуоресцентным зондом 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата (Sigma-Aldrich).

В качестве растворителя 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата (Sigma-Aldrich) использовали диметилсульфоксид (DMSO). Под действием диметилсульфоксида 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата растворяется и входит в клетки, где под действием эстераз утрачивает лиофильность и теряет способность проходить через клеточную мембрану.

К клеточной суспензии каждого исследуемого органа добавляли по 20 мкл готового АФК-зависимого зонда, в конечной концентрации 20 мкМ, с которым выделенные клетки органов инкубировали в течение 20 мин. После этого 10 мкл клеток наносили на предметное стекло, которое затем помещали на предметный столик инвертированного микроскопа (PrimoVert, Zeiss) и фиксировали уровень флуоресценции.

Выявление АФК флуоресцентным зондом под микроскопом

Принцип метода определения АФК основан на взаимодействии супероксидного радикала с АФК- зависимым зондом, способным к флуоресценции. Таким зондом является 2',7'- дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH₂-DA). Он представляет собой бесцветный нефлуоресцирующий краситель, способный диффундировать через липидную мембрану клеток.

2',7'-дихлорфлуоресцеин после диффузии в клетку деацетилируется внутриклеточными эстеразами с образованием DCFH₂, не флуоресцирующего соединения, которое обладает меньшей способностью проникать через клетки, что объясняется наличием заряда. Далее окисление внутриклеточными активными формами кислорода DCFH₂ приводит к образованию 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) (Рисунок 5), способного интенсивно флуоресцировать в зеленой части спектра (максимум возбуждения 485-500 нм) [16].

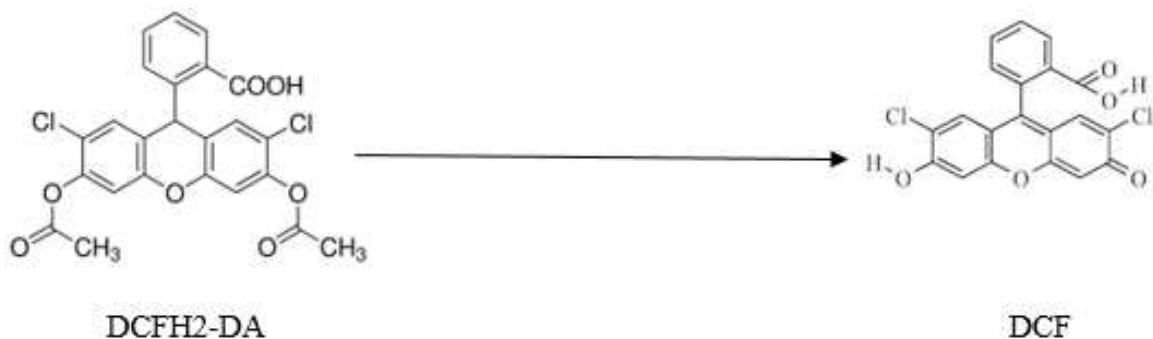


Рисунок 5 – Схема образования 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF)

DCFH₂-DA позволяет детектировать такие виды АФК, как пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$), пероксинитрит-ион (ONOO^-), супероксидный радикал ($\cdot\text{O}_2^-$). Наличие АФК в пробе определяли 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

Был разработан препарат для интраоперационного окрашивания рака лёгкого. Препарат на основе аптамеров с квантовыми точками позволяет окрашивать раковые очаги в поражённых тканях лёгких, тем самым визуализируя малозаметные раковые клетки без хирургического микроскопа, используя лишь ультрафиолетовый фонарь с подходящими фильтрами.

Отсутствие токсичности позволяет препарату быть кандидатом для применения на пациентах.

Список использованных источников

1. Wu, S. Multiplexed detection of lung cancer biomarkers based on quantum dots and microbeads / S. Wu [et al.] // *Talanta*. – 2016. – Т. 156. – С. 48-54.
2. Крат, А. В. Использование ДНК-аптамеров в оценке распространенности опухолевого процесса у больных раком легкого / А. В. Крат [и др.] // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2016. – №. 5 (101).
3. Колесников, И. С. Хирургия лёгких и плевры. / И. С. Колесников, М.И. Лыткин // *Медицина*. – 1988. – С. 320 – 331.
4. Kozower, B. D. Surgical management of non-small cell lung cancer / B. D. Kozower // Pearson's Thoracic and Esophageal Surgery. – 2008. – Т. 1. – С. 765-80.
5. Здобнова, Т. А. Квантовые точки для молекулярной диагностики опухолей / Т.А. Здобнова [и др.] // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2011. – Т. 3. – №. 1.
6. Орлов, С. В. Симптоматика, диагностика и стадирование немелкоклеточного рака легкого / С. В. Орлов // *Проблемы туберкулеза*. – 2000. – Т. 1. – №. 3. – С. 8-16.
7. Marx, A. The 2015 World Health Organization classification of tumors of the thymus: continuity and changes / A. Marx [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2015. – Т. 10. – №. 10. – С. 1383-1395.
8. de Groot, P. M. The epidemiology of lung cancer / P. M. de Groot [et al.] // *Translational lung cancer research*. – 2018. – Т. 7. – №. 3. – С. 220.
9. Torre, L. A. Lung cancer statistics / L. A. Torre [et al.] // *Lung cancer and personalized medicine*. – Springer, Cham, 2016. – С. 1-19.
10. Malvezzi, M. European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer / M. Malvezzi // *Annals of Oncology*. – 2017. – Т. 28. – №. 5. – С. 1117-1123.
11. Siegel, R. L. Cancer statistics, 2018 / R. L. Siegel [et al.] // *CA: a cancer journal for clinicians*. – 2018. – Т. 68. – №. 1. – С. 7-30.

12. Arnold, B. N. Lung cancer in the very young: treatment and survival in the national cancer data base / B. N. Arnold [et al.] // Journal of Thoracic Oncology. – 2016. – Т. 11. – №. 7. – С. 1121-1131.
13. Inamura, K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification / K. Inamura // Frontiers in oncology. – 2017. – Т. 7. – С. 193.
14. Myers, D. J. Cancer, lung adenocarcinoma / D. J. Myers, J. M. Wallen // StatPearls [Internet]. – StatPearls Publishing, 2019.
15. Rosner, M. Squamous cell carcinoma / M. Rosner, I. D. Fabian // Clinical Ophthalmic Oncology. – Springer, Cham, 2019. – С. 45-52.
16. Takano, A. Detection of metastatic lesions from malignant pheochromocytoma and paraganglioma with diffusion-weighted magnetic resonance imaging: comparison with 18 F-FDG positron emission tomography and 123 I-MIBG scintigraphy / A. Takano [et al.] // Annals of nuclear medicine. – 2008. – Т. 22. – №. 5. – С. 395.
17. Patel, P. Molecular challenges of neuroendocrine tumors / P. Patel, K. Galoian // Oncology letters. – 2018. – Т. 15. – №. 3. – С. 2715-2725.
18. Ailles, L. E. Cancer stem cells in solid tumors / L. E. Ailles, I. L. Weissman // Current opinion in biotechnology. – 2007. – Т. 18. – №. 5. – С. 460-466.
19. Ward, R. J. Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development / R. J. Ward, P. B. Dirks // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. – 2007. – Т. 2. – С. 175-189.
20. Smith, C. J. Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers / C. J. Smith [et al.] // Inhalation toxicology. – 2006. – Т. 18. – №. 9. – С. 667-677.
21. Gomperts, B. N. Evolving concepts in lung carcinogenesis // Seminars in respiratory and critical care medicine / B. N. Gomperts [et al.] // Thieme Medical Publishers. – 2011. – Т. 32. – №. 01. – С. 032-043.
22. Горбань, Н. А. Мелкоклеточный рак предстательной железы: клинико-морфологические аспекты / Н. А. Горбань [и др.] // Онкоурология. – 2012. – №. 2.

23. Васильев, Р. Б. Квантовые точки: синтез, свойства, применение / Р. Б. Васильев, Д. Н. Дирин // М.: МГУ. – 2007. – С. 50.
24. Alivisatos, A. P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots / A. P. Alivisatos // Science. – 1996. – Т. 271. – №. 5251. – С. 933-937.
25. Bera, D. Quantum dots and their multimodal applications: a review / D. Bera [et al.] // Materials. – 2010. – Т. 3. – №. 4. – С. 2260-2345.
26. Bruchez, M. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels / M. Bruchez [et al.] // Science. – 1998. – Т. 281. – №. 5385. – С. 2013-2016.
27. Kairdolf, B. A. Coated quantum dots and methods of making and using thereof : заяв. пат. 12864763 США. – 2011.
28. Medintz, I. L. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing / I. L. Medintz [et al.] // Nature materials. – 2005. – Т. 4. – №. 6. – С. 435-446.
29. Medintz I. L. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors / I. L. Medintz [et al.] // Nature materials. – 2003. – Т. 2. – №. 9. – С. 630-638.
30. Bagalkot, V. Quantum dot– aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer / V. Bagalkot [et al.] // Nano letters. – 2007. – Т. 7. – №. 10. – С. 3065-3070.
31. Mastronardi, E. Smart materials based on DNA aptamers: taking aptasensing to the next level / E. Mastronardi [et al.] // Sensors. – 2014. – Т. 14. – №. 2. – С. 3156-3171.
32. Blind M., Blank M. Aptamer selection technology and recent advances //Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2015. – Т. 4. – С. e223.
33. Nakamura, Y. tRNA mimicry in translation termination and beyond / Y. Nakamura, K. Ito // Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. – 2011. – Т. 2. – №. 5. – С. 647-668.
34. Long, S. B. Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin / S. B. Long [et al.] // Rna. – 2008. – Т. 14. – №. 12. – С. 2504-2512.
35. Adachi, T., Nakamura Y. Aptamers: A review of their chemical properties and

- modifications for therapeutic application //Molecules. – 2019. – Т. 24. – №. 23. – С. 4229.
- 36.Lakhin, A. V. Aptamers: problems, solutions and prospects / A. V. Lakhin [et al.] // Acta Naturae (англоязычная версия). – 2013. – Т. 5. – №. 4 (19).
- 37.Zhuo, Z. Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine / Z. Zhuo [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2017. – Т. 18. – №. 10. – С. 2142
- 38.Кульбачинский, А. В. Методы отбора аптамеров к белковым мишениям / А. В. Кульбачинский // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 193-224.
- 39.Wang, L. QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella typhimurium* / L. Wang [et al.] // Food chemistry. – 2017. – Т. 221. – С. 776-782.
- 40.Lou, X. Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels / X. Loy [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Т. 106. – №. 9. – С. 2989-2994.
- 41.Keefe, A. D., Pai S., Ellington A. Aptamers as therapeutics / A. D. Keefe [et al.] // Nature reviews. Drug discovery. – 2010. – Т. 9. – №. 7. – С. 537-550.
- 42.Ray, P. D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P. D. Ray [et al.] // Cellular signalling. – 2012. – Т. 24. – №. 5. – С. 981-990.
- 43.Apel, K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel [et al.] // Annu. Rev. Plant Biol. – 2004. – Т. 55. – С. 373-399.
- 44.Кормош, Н. Г. Физиологическая роль активных форм кислорода на клеточном уровне и организма в целом-взгляд клинициста. Ч. 2 // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. – №. 1.
- 45.Магеррамов, А. М. Активные формы кислорода в живых системах / А. М. Магеррамов [и др.] // Биология. – 2009. – №. 4. – С. 56-59.
- 46.Kim, S. C. Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulphhydryl deficiency / S. C. Kim [et al.] //

Toxicology letters. – 2003. – Т. 144. – №. 3. – С. 325-336.

47. Belyaeva, E. A. Reactive oxygen species produced by the mitochondrial respiratory chain are involved in Cd²⁺-induced injury of rat ascites hepatoma AS-30D cells / E. A. Belyaeva [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2006. – Т. 1757. – №. 12. – С. 1568-1574.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Елена Е. И. Шишацкая
«6 » июня 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Разработка препарата для интраоперационного окрашивания рака лёгкого и
оценка его токсичности

Руководитель
Доцент, канд. бiol. наук Н. М. Титова Н. М. Титова

Консультант
Профessor, д-р бiol. наук Т. Н. Замай Т. Н. Замай

Выпускник И. О. Перепелицын И. О. Перепелицын

Красноярск 2020