

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биоинженерии и биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Использование биосенсора на основе золотых наночастиц для диагностики височной эпилепсии по концентрации микроРНК, выделенной из плазмы

Руководитель \_\_\_\_\_ Доцент, к.б.н. О.А. Гусейнов

Выпускник \_\_\_\_\_ С.А. Дмитриенко

Красноярск 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1.1 Биогенез.....	8
1.1.2 Строение.....	10
1.1.3 Функции .....	11
1.2 Диагностика височной эпилепсии на основе микроРНК.....	13
1.3 Существующие методы анализа микроРНК .....	17
1.3.1 ПЦР в реальном времени.....	17
1.3.2 Микрочипы .....	21
1.3.3 Биосенсоры .....	24
1.4 Сшивающая агрегация наночастиц золота.....	25
1.5 Золотые наночастицы и методы их получения .....	27
1.6 Анализ динамического светорассеивания .....	29
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1 Методика синтеза золотых наночастиц .....	34
2.2 Методика конъюгации ДНК-зондов с золотыми наночастицами .....	35
2.3 Проведение проверки конъюгации ДНК-зондов с золотыми наночастицами.....	36
2.4 Методика подготовки плазмы крови.....	37
2.5 Методика проведения анализа содержания микроРНК.....	37
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	47
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	49

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка биосенсоров для диагностики заболеваний является важным направлением в современной медицине. Использование биосенсоров для диагностики заболеваний обладает рядом значительных преимуществ.

Биосенсоры позволяют проводить диагностику заболеваний быстро и эффективно. Благодаря изучению специфических биохимических процессов и использованию современных технологий, биосенсоры способны обнаруживать болезнь на ранних стадиях, когда симптомы еще не проявились. Это позволяет начать лечение раньше и повысить шансы на полное выздоровление у пациентов.

Биосенсоры обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Они позволяют выявить наличие и определить концентрацию различных биомаркеров, связанных с конкретным заболеванием, что делает использование биосенсоров очень востребованным в диагностике. Это особенно важно для диагностики редких или сложных заболеваний, где точная диагностика играет решающую роль.

Использование биосенсоров для диагностики заболеваний обычно не требует инвазивных процедур. Большинство биосенсоров работают на основе анализа биологических жидкостей, таких как кровь, моча или слюна, что делает процесс диагностики безболезненным и комфортным для пациента.

Биосенсоры могут быть использованы для постоянного мониторинга состояния здоровья пациента. Они позволяют своевременно выявить изменения в организме и поспособствовать коррекции лечения, что особенно важно при хронических заболеваниях или при процессе реабилитации после операций.

Таким образом, разработка биосенсоров для современной медицины очень важна. Использование биосенсоров помогает улучшить качество жизни пациентов, повысить эффективность лечения и снизить нагрузку на систему здравоохранения.

## **Актуальность работы**

Современные исследования показывают, что молекулы микроРНК могут быть значимыми диагностическими маркерами многих заболеваний. Размеры этих молекул и их содержание в биологических жидкостях чрезвычайно малы. Современные классические методы, такие как количественная ПЦР требуют большое количество времени и ресурсов, что значительно затрудняет процесс диагностики. Поэтому существует потребность в разработке чувствительных и быстрых методов количественного анализа микроРНК в формате биосенсоров.

Разработка биосенсора для диагностики височной эпилепсии весьма насущна. Височная эпилепсия - это одна из форм эпилепсии, при которой очаг эпилептической активности локализуется в височной доли головного мозга. Височная эпилепсия характеризуется простыми и сложными парциальными эпилепсиями, а при дальнейшем развитии заболевания вторично-генерализованными припадками и психическими расстройствами. Височная эпилепсия является одной из наиболее часто встречающихся форм эпилепсии. При этом диагностика данного заболевания с помощью классических методов (ЭЭГ, МРТ) в клинической практике часто является не эффективной.

**Цель работы:** разработать биосенсор на основе золотых наночастиц, способный производить диагностику височной эпилепсии по уровню концентрации микроРНК в плазме крови.

На основании поставленной цели были определены следующие **задачи:**

1. Подобрать нуклеотидные последовательности ДНК-зондов, способных комплиментарно связываться с микроРНК-134. Синтезировать золотые наночастицы диаметром 20 нм методом Туркевича.
2. Конъюгировать полученные наночастицы с ДНК-зондами.
3. Подобрать оптимальные условия проведения аналитической реакции: время и температуру инкубации, оптимальный объём вносимого образца, концентрацию наночастиц.
4. Провести диагностику височной эпилепсии с помощью конъюгата наночастиц с ДНК-зондами и оценить эффективность метода.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 МикроРНК

МикроРНК были впервые обнаружены как антисмысловые транскрипты у нематоды *Caenorhabditis elegans*, где они подавляли экспрессию генов, содержащих в мРНК комплементарные последовательности. Таким образом, данные молекулы являются основными молекулами, регулирующими экспрессию генов. МикроРНК представляют собой небольшие молекулы, транскрибируемые с геномной ДНК и подвергающиеся дальнейшему процессингу и экспорту в цитоплазму.

МикроРНК представляют собой большое семейство коротких некодирующих последовательностей РНК, размером приблизительно 18–25 нуклеотидов, синтезируемых в ядре клетки в результате сложного многоступенчатого процесса биосинтеза. Предполагается, что геном человека содержит более 2500 зрелых микроРНК [8,9].

Эти нуклеотиды модулируют экспрессию генов, связывая 3'-нетранслируемую область целевой матричной РНК (мРНК), как разрушая мРНК, так и ингибируя трансляцию белка. МикроРНК регулируют широкий спектр биологических процессов, таких как дифференцировка клеток, пролиферация и рост, а также межклеточная коммуникация, клеточный метаболизм и апоптоз [9,10]

МикроРНК содержатся в клетках тканей, но их также можно обнаружить во внеклеточных участках, таких как плазма и другие жидкости организма, в которых они переносятся внутри небольших мембранных везикул (экзосом), в виде липопротеиновых комплексов высокой плотности или в комплексе с белками-носителями. В 2008 году микроРНК были также обнаружены в тромбоцитах, эритроцитах и ядросодержащих клетках крови [6,11]

Внеклеточные микроРНК в экзосомах могут переноситься в другие клетки, изменяя экспрессию генов и оказывая эффект на функциональность приемников [12,13,14]. Имеются доказательства того, что микроРНК могут

играть роль в молекулярных механизмах, связанных с клеточными путями развития определенных заболеваний, таких как вирусные инфекции, рак, диабет и сердечно-сосудистые заболевания [8,9,15,16].

При множестве патологий происходит нарушение регуляции экспрессии микроРНК, что позволяет использовать изменения уровней экспрессии этих микроРНК в роли биомаркера того или иного заболевания. Так же клетки способны секретировать некое количество микроРНК во внеклеточную среду, что в свою очередь и объясняет наличие этих микроРНК в различных жидкостях организма и создает интерес для изучения циркулирующих микроРНК как биомаркеров. Циркулирующие микроРНК удивительно стабильны в кровотоке, поэтому их можно идентифицировать и измерить в циркулирующей крови [16].

Хорошо известно, что один ген, в свою очередь, может регулироваться множеством микроРНК, поэтому, учитывая большое количество микроРНК, аннотированных в геноме человека, прогнозируется, что от 30% до 80% человеческих генов находятся под влиянием микроРНК. Более того, одна микроРНК влияет на экспрессию сотен уникальных микроРНК, а aberrantная экспрессия микроРНК может влиять на множество транскриптов и может оказывать влияние на сигнальные пути, связанные с заболеванием. Такой процесс порождает сложную сеть, поэтому анализ нескольких микроРНК, следовательно, более эффективен при изучении заболеваний, чем анализ одной микроРНК [17].

Характеристики микроРНК, которые обуславливают возможность использования их в роли биомаркеров:

- микроРНК в биологических жидкостях высокостабильны;
- микроРНК устойчивы к различным внешним факторам, что так же дает возможность эффективного выделения из биожидкостей организма;
- соизмеримость уровней микроРНК в норме в организме независимо от пола.

Однако работа с микроРНК (miRNA) может быть сложной из-за их специфических свойств и ряда особенностей:

1. Малая длина: МикроРНК обычно состоят из 18-25 нуклеотидов. Это значительно короче других типов РНК. Это усложняет их обнаружение и анализ.

2. Регуляция генов: МикроРНК играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов путем связывания с мРНК и ингибирования их трансляции или ускорения распада. Изучение воздействия микроРНК на генетические процессы требует сложных методов анализа.

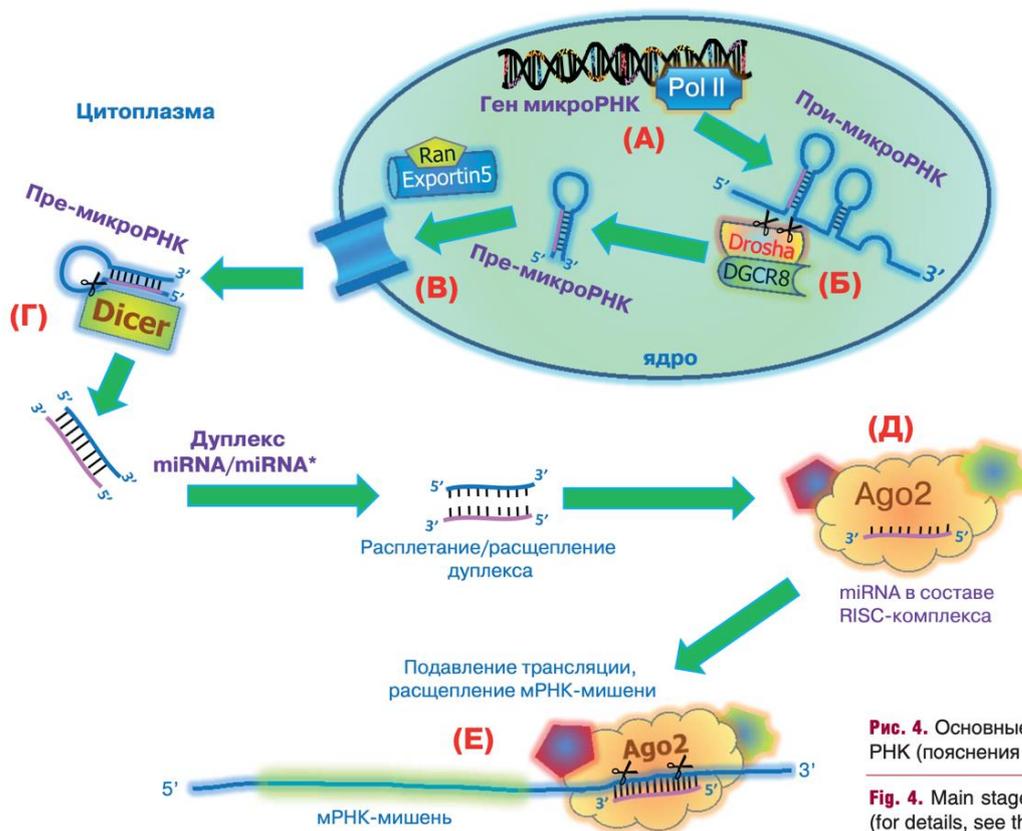
3. Множество целевых генов: Одна микроРНК может взаимодействовать с несколькими целевыми генами, что усложняет понимание ее функций и последствий.

Недостатком микроРНК в качестве биомаркеров может служить высокая изменчивость уровней экспрессии микроРНК под влиянием множества факторов. В свою очередь это может давать различия в группах микроРНК, которые исследуются как возможные маркеры. Для достоверности результатов используют дополнительную валидацию и увеличение выборки образцов. Также необходима точная статистическая обработка. Однако, даже учитывая все эти факторы, уже есть рекомендации использования отдельных групп микроРНК в качестве биомаркеров и предикторов различных патологий.

### 1.1.1 Биогенез

#### Транскрипция микроРНК-генов, процессинг в ядре.

Первым этапом биогенеза микроРНК является транскрипция с ДНК, которая, как правило, осуществляется РНК-полимеразой II — тем же ферментом, который транскрибирует гены (рис. 4, А). Более того, очень часто (у человека в большинстве случаев) участки, кодирующие микроРНК, находятся внутри белок-кодирующих генов. Таким образом, во многих случаях первичным продуктом может выступать обычная матричная РНК. Однако в общем случае РНК-транскрипт, служащий предшественником микроРНК, обозначают как *pri-miRNA*. МикроРНК чаще закодированы в интронах, но экзон-локализованные микроРНК также широко распространены. Единственным обязательным критерием является наличие самокомплементарного участка, способного формировать шпильку на транскрибированной РНК. Такая структура *pri-miRNA* еще в ядре распознается и отрезается от остального транскрипта ферментным комплексом, включающим белки *Drosha* (относится к семейству РНКаз III) и *Pasha* (от *partner of Drosha*, *DGCR8*) (рис. 4, Б). В качестве вспомогательных компонентов этого комплекса (называемого также микропроцессором) могут присутствовать хеликазы и гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды (*hnRNP*). Менее распространенным путем является процессинг без участия микропроцессора, т. е. за счет механизма сплайсинга. Это происходит в тех случаях, когда область шпильки совпадает с границами вырезаемого интрона. Результатом процессинга *pri-miRNA* является фрагмент РНК длиной 60–70 нуклеотидов, называемый *pre-miRNA*. Этот фрагмент содержит в своем составе двухцепочечный участок: две самокомплементарных области, соединенные петлей, и небольшой одноцепочечный участок на 3'-конце. Совокупность этих элементов распознает белок экспортин-5 в комплексе с малой ГТФазой *Ran* (рис. 4, В) [18].



**Рис. 4.** Основные этапы биогенеза микро-РНК (пояснения в тексте)

**Fig. 4.** Main stages of microRNA biogenesis (for details, see the text)

## Рисунок 1 - Биогенез микроРНК.

А - Транскрипция с ДНК

Б – Шпилька распознаётся и отрезается от основного транскрипта ферментативным комплексом, включающим белки Drosha и Pasha

В – Пре-микроРНК распознает белок экспортин-5 в комплексе с малой ГТФазой Ran

Г – Распознаванием ферментом Dicer

Д – Связывание белком Ago2 из семейства Argonaute

Е - Подавление экспрессии гена

**Экспорт из ядра и формирование активных комплексов в цитоплазме.**

В цитоплазме структурные элементы пре-микроРНК — двухцепочечная шпилька и короткий неспаренный участок на ее конце — распознаются ферментом Dicer (рис. 4, Г). Dicer имеет в своем составе домен PAZ (распознает

неспаренный конец шпильки), двухцепочечный РНК-связывающий домен, хеликазный домен и два домена с активностью РНКазы III. После связывания и правильного позиционирования Dicer на молекуле пре-микроРНК РНКазные домены вносят два разрыва в РНК возле петли, отрезая ее от шпильки. Образованный двухцепочечный РНК-продукт длиной около 22 нуклеотидов связывается белком Ago2 из семейства Argonaute (рис. 4, Д). Из двух цепей РНК, образовавшихся после отщепления петли, только одна остается связанной с Ago2, в то время как другая диссоциирует от комплекса и, как правило, деградирует. Выбор ведущей цепи определяется структурой самого дуплекса: большую вероятность остаться в комплексе с Ago2 имеет цепь, несущая неспаренный участок на своем 5'-конце. Комплекс Ago2 с единичной цепью РНК, а также белком GW182 обозначается как miRISC (miRNA-induced silencing complex).

### 1.1.2 Строение

МикроРНК (мРНК) - это короткие однонитевые РНК-молекулы, играющие важную роль в регуляции экспрессии генов и различных клеточных процессах. Структура микроРНК представляет собой последовательность нуклеотидов, состоящую из около 18-25 оснований. По форме молекула представляет собой шпильку. Длина микроРНК может варьироваться в зависимости от конкретного типа микроРНК и его функционального назначения [24].



Рисунок 2 - Структура микро РНК hsa-let-7f-2. Информация из базы данных MiRbase.

Особенности последовательности нуклеотидов микроРНК заключаются в их специфичности и уникальности. Каждый тип микроРНК имеет свою уникальную последовательность нуклеотидов, которая определяет его способность взаимодействия с молекулами мРНК или ДНК, а также его роль в клеточных процессах. Например, некоторые микроРНК способны специфически связываться с определенными участками мРНК и ингибировать их трансляцию.

Различия между разными типами микроРНК заключаются не только в их длине и последовательности нуклеотидов, но и в их специфической функции и роли в клеточных процессах. Каждый тип микроРНК имеет свои уникальные цели и мишени, с которыми он взаимодействует, что определяет его влияние на генетическую регуляцию и клеточные функции.

Таким образом, структура микроРНК, ее длина, особенности последовательности нуклеотидов и различия между разными типами микроРНК играют ключевую роль в понимании механизмов регуляции генной экспрессии и клеточных процессов. Исследования в этой области продолжают расширять наши знания о функциях микроРНК и их потенциальном применении в различных областях биологии и медицины.

### **1.1.3 Функции**

RISC-комплекс в цитоплазме обеспечивает главный эффект микроРНК — подавление экспрессии генов, мРНК которых имеет участок, комплементарный последовательности микроРНК. Такие гены называются мишенями для данной микроРНК. Важнейшим этапом в выборе мишени является распознавание в мРНК последовательности, которая была бы комплементарна со 2-го по 8-й нуклеотид микроРНК. Последние образуют так называемую ключевую последовательность микроРНК. Комплементарность (необязательно полная) между ключевой последовательностью микроРНК и последовательностью мРНК обеспечивает посадку RISC-комплекса на мРНК-мишень.

Посадка RISC-комплекса на мРНК-мишень может иметь разные последствия, которые зависят в т. ч. и от степени комплементарности между микроРНК и мРНК. В случае полной комплементарности включается РНКазная активность Ago2, который разрезает мРНК в месте посадки. Такая РНК быстро расщепляется клеточными рибонуклеазами. Прочие механизмы подавления трансляции не требуют полной комплементарности. В частности, рекрутирование белком GW182 деаденилаз CCR4-NOT и PAN2-PAN3 обеспечивает отщепление от мРНК полиА-сигнала, а привлечение белков DCP1/2 ведет к удалению кэпа. В обоих случаях мРНК становится нефункциональной и в дальнейшем деградирует. Наконец, само по себе нахождение RISC- комплекса на мРНК препятствует посадке и продвижению на рибосоме. Следует отметить, что в отдельных случаях микроРНК могут являться не репрессорами, а прямыми активаторами трансляции.

Таким образом, микроРНК в составе RISC-комплекса осуществляет «выключение» экспрессии своих генов - мишеней, причем выбор мишеней определяется последовательностью микроРНК, точнее — наличием комплементарной ей последовательности в мРНК. Одна и та же микроРНК может воздействовать на все мРНК, имеющие в своей последовательности соответствующие сайты связывания. Более того, поскольку для посадки RISC-комплекса не требуется полной комплементарности, эти сайты могут иметь слегка различающиеся последовательности. Фактически микроРНК является исключительно универсальным механизмом подавления экспрессии и поэтому задействована в регуляции широкого спектра клеточных процессов (по разным оценкам, от 30 до 60 % генов человека являются мишенями микроРНК). Кроме того, одна мРНК может нести множество сайтов связывания для одной или разных микроРНК, что создает еще больше вариантов для гибкой регуляции их действия.

## 1.2 Диагностика височной эпилепсии на основе микроРНК

Эпилепсия – это хроническое неврологическое заболевание, которое характеризуется наличием повторяющихся приступов, являющихся следствием патологического синхронного возбуждения нейронов головного мозга [2]. Диагноз эпилепсия устанавливается на основании клинической картины заболевания, данных электроэнцефалограммы (ЭЭГ), а также данных магнитнорезонансной томографии (МРТ) головного мозга. В ряде случаев уточнение характера приступов и, как следствие, выбор актуальной терапии для пациента является непростой задачей.

Височная эпилепсия является одной из наиболее распространенных форм эпилепсии. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), эпилепсия в целом затрагивает около 50 миллионов людей по всему миру, и височная эпилепсия составляет значительную часть всех случаев.

Люди с эпилепсией, включая височную форму, имеют повышенный риск смертности по сравнению с общей популяцией. Причины смертности могут быть разнообразными, включая приступы с остановкой дыхания, травмы в результате приступов, побочные эффекты лекарственного лечения, а также возможные осложнения.

Височная эпилепсия, или темпоральная эпилепсия, является одной из наиболее распространенных форм эпилепсии. Ее причины могут быть разнообразными и включать следующие факторы:

1. Структурные изменения в мозге: Врожденные аномалии мозга, опухоли, травмы головы, инфекции или другие структурные изменения могут привести к развитию височной эпилепсии.

2. Неврологические заболевания: Некоторые неврологические состояния, такие как сосудистые нарушения, инсульты, дегенеративные заболевания мозга и синдромы, могут способствовать возникновению эпилептических приступов.

3. Генетическая предрасположенность: Наследственные факторы могут играть роль в появлении височной эпилепсии. Некоторые формы эпилепсии могут передаваться по наследству.

4. Воспалительные процессы: Воспаление мозга, вызванное инфекциями или иммунными расстройствами, может быть связано с развитием эпилепсии.

5. Травмы: Травматические повреждения мозга, такие как черепно-мозговые травмы, могут стать причиной последующего развития эпилепсии.

Исследования показали, что микроРНК могут быть вовлечены в процесс эпилептогенеза путем регулирования воспалительного ответа, апоптоза нейронов и факторов транскрипции, участвующих в дифференцировке клеток [38, 46].

В исследовании Reschke et al (2015) [27] было обнаружено, что компоненты пути биогенеза микроРНК изменяются в тканях головного мозга у пациентов с эпилепсией, что приводит к определенным изменениям в составе микроРНК, регулирующих микроструктуру нейронов, гибель клеток, воспаление и апоптоз. Измененные профили микроРНК в биожидкостях могут быть потенциально полезными биомаркерами эпилептогенеза. Было показано, что воздействие на ключевые микроРНК изменяет возбудимость мозга и подавляет или усугубляет судороги, что указывает на потенциал терапии эпилепсии на основе микроРНК.

На данный момент было проведено несколько целевых исследований и исследований профилирования экспрессии микроРНК в масштабах всего генома. (Song et al., 2011; Hu et al., 2012; Kan et al., 2012; Bot et al., 2013; Gorter et al., 2014;). В ходе этих исследований идентифицировали более 100 различных микроРНК у пациентов с эпилепсией или на животных моделях с эпилепсией и предоставили убедительные доказательства того, что эпилепсия связана с изменениями экспрессии микроРНК. Хотя сообщалось, что многие циркулирующие микроРНК связаны с эпилепсией, достоверны ли эти микроРНК

в отношении риска развития эпилепсии, прогнозировании заболевания, диагностике или предсказании исхода пока не ясно и данные нуждаются в дальнейшей проверке.

Wang J et al (2015) [49] сообщили, что уровни содержания нескольких типов микроРНК были повышены, тогда как содержание miR-194-5p было снижено у пациентов с эпилепсией по сравнению с контрольной группой ( $P < 0,0001$ ). Основной целью исследования было выяснить, можно ли использовать эти нерегулируемые микроРНК в сыворотке крови в качестве новых неинвазивных диагностических биомаркеров у пациентов с эпилепсией. Среди этих микроРНК miR-134 обладала наилучшей диагностической ценностью при эпилепсии с чувствительностью 80,3% и специфичностью 81,2%.

Исходя из анализа научных публикаций на тему исследования микроРНК как биомаркера [18,19,20] при различных патологических процессах в данной работе был сделан акцент на исследования микроРНК- 134.

МикроРНК-134 конститутивно экспрессируется в мозге взрослого человека в нейронах и обнаруживается в теле нейрона, а также в дендритах [21,22,23]. Было обнаружено, что чрезмерная экспрессия miR-134 в нейронах *in vitro* уменьшает объем дендритного отростка нейрона, в то время как ингибирование miR-134 приводит к небольшому увеличению его объема. Механизм этих изменений был определен посредством локальной направленной трансляции микроРНК-134 Lim- домена, содержащего киназу 1 (Limk1) внутри дендритов. Limk1 фосфорилирует и ингибирует фактор деполимеризации актина (ADF / cofilin), тем самым способствуя образованию F-actin, который является критическим для увеличения объема отростка. Ингибируя Limk1, микроРНК-134 способствует коллапсу отростка посредством увеличения G-actin в отростках нейрона. Учитывая связь между объемом дендритного отростка и возбуждающей синаптической силой, это имеет очевидные последствия для патологии повышенной возбудимости, такого как эпилепсия. Таким образом,

miR-134 является потенциально важным регулятором развития мозга и синаптической пластичности.

Исследователи связывают влияние микроРНК на развитие эпилептических приступов с нейровоспалением и изменениями в микроструктуре нейронов. Дисрегуляция микроРНК-134 изменяет количество и объем дендритных шипов на возбуждающих нейронах, что приводит к развитию височной эпилепсии.

В настоящее время диагностика височной эпилепсии существенно затруднена по следующим причинам:

1. Неспецифические симптомы: Симптомы височной эпилепсии могут быть неспецифичными и проявляться в виде различных неврологических симптомов, таких как головокружение, головная боль, расстройства зрения или слуха. Эти симптомы могут быть связаны с другими заболеваниями, что затрудняет дифференциальную диагностику.

2. Эпизодический характер: Височная эпилепсия часто проявляется эпизодическими приступами, которые могут быть непредсказуемыми и не повторяться регулярно. Это затрудняет наблюдение и регистрацию приступов для диагностических целей.

3. Сложности в получении данных: Для точной диагностики височной эпилепсии требуется собрать достаточное количество данных о приступах, их характеристиках и возможных провоцирующих факторах. Однако пациенты могут иметь ограниченный доступ к медицинскому обследованию или не могут всегда предоставить подробную информацию о своих симптомах.

4. Неоднородность симптомов: Височная эпилепсия может проявляться различными симптомами, которые могут отличаться от пациента к пациенту. Некоторые люди могут испытывать явные эпилептические припадки, в то время как у других могут быть более тонкие или атипичные проявления. Это усложняет постановку диагноза и требует более тщательного анализа симптомов и результатов обследования.

5. Необходимость комплексного подхода: Диагностика височной эпилепсии требует комплексного подхода, который может включать клиническое обследование, нейрофизиологические исследования (электроэнцефалограмма - ЭЭГ), нейровизуализацию (магнитно-резонансная томография - МРТ) и другие методы. Комбинирование различных методов может быть необходимо для получения полной картины и установления диагноза.

Все эти факторы в совокупности делают диагностику височной эпилепсии сложной и требующей опытности врача, специализирующегося в этой области.

### **1.3 Существующие методы анализа микроРНК**

#### **1.3.1 ПЦР в реальном времени**

**qRT-PCR** используется в течение нескольких лет для анализа циркулирующих микроРНК и считается эталонным методом [28]. Преимущество заключается в том, что его можно легко использовать в повседневной практике. Кроме того, он чувствителен, специфичен и предлагает широкий диапазон измерений. Эту технологию можно применять для конкретной микроРНК или панелей из нескольких сотен микроРНК, что требует использования микропланшетов, в которых каждая лунка содержит специфические праймеры для определенных микроРНК. Некоторые специфические свойства микроРНК делают их обнаружение особенно сложными. Действительно, малый размер этих олигонуклеотидов и отсутствие общей последовательности, такой как поли(А) — хвост для мРНК, не позволяют использовать обычные праймеры. Вот почему в соответствии с платформами qRT-PCR используются две категории методов. Они отличаются разработанными праймерами и методами детекции. Первый основан на использовании праймера типа stem-loop для осуществления обратной транскрипции микроРНК. Образованную кДНК затем амплифицируют обычными праймерами (reverse and forward primers), количественно определяют

в реальном времени мечеными флуорофорами, которые добавляют к реакционной среде. Этот метод используется в таких платформах, как TaqMan Cards (Life Technologies). Второй включает полиаденилирование микроРНК с использованием фермента: поли(А)-полимеразы *Escherichia coli*, антисмыслового праймера, содержащего последовательность поли(Т), с обеих сторон, что позволяет выполнить действие обратной транскрипции. Затем проводят амплификацию вместе со смысловым праймером. Платформы, такие как Qiagen и Stratagene, используют обычные праймеры, тогда как Exiqon использует праймеры, содержащие LNA-нуклеотиды, что дает им большую специфику. Во всех случаях продукты амплификации обнаруживаются интеркалирующим агентом SYBR Green, чья флуоресценция увеличивается примерно в 100 раз при включении в двуцепочечную структуру. Таким образом, можно достичь абсолютной количественной оценки микроРНК [48].

Основные особенности ПЦР в реальном времени:

1. Кинетический мониторинг: в отличие от обычной ПЦР, где продукты амплификации анализируются после окончания реакции, ПЦР в реальном времени позволяет наблюдать и измерять количество амплифицированной ДНК (или РНК) на каждом цикле амплификации. Это позволяет получить информацию о количестве исходного материала и оценить его концентрацию.

2. Использование флуоресцентных зондов: для детектирования амплифицированной ДНК (или РНК) в реальном времени применяются специальные флуоресцентные зонды, которые связываются с участком амплифицированной ДНК (или РНК) и испускают свет при освещении. Это позволяет наблюдать и измерять уровень флуоресценции на каждом цикле амплификации.

3. Количественная оценка: благодаря возможности кинетического мониторинга и использованию флуоресцентных зондов, ПЦР в реальном времени позволяет количественно оценить начальное количество ДНК (или РНК) в образце. Это особенно полезно при определении экспрессии генов,

диагностике инфекций или мутаций, определении генетического полиморфизма и т. д.

4. Высокая чувствительность и специфичность: ПЦР в реальном времени обладает высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет обнаруживать даже небольшие количества ДНК (или РНК) в образце и идентифицировать конкретные последовательности.

5. Автоматизация и стандартизация: современные системы ПЦР в реальном времени обеспечивают автоматизацию процесса амплификации и анализа данных, что позволяет повысить точность и воспроизводимость результатов. Кроме того, существуют стандартные протоколы и методические рекомендации для проведения ПЦР в реальном времени, что способствует стандартизации этого метода.

ПЦР в реальном времени широко применяется в научных и клинических исследованиях, медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и других областях, где требуется чувствительное и количественное определение ДНК (или РНК).

ПЦР в реальном времени обычно состоит из следующих стадий:

1. Предварительная подготовка: В этой стадии проводятся предварительные манипуляции для подготовки образцов ДНК (или РНК) к амплификации. Это может включать экстракцию и очистку нуклеиновых кислот, приготовление реакционной смеси и добавление флуоресцентных зондов или прямых/обратных праймеров.

2. Термоциклирование: далее следует серия циклов нагревания и охлаждения, которые проводятся в термоциклере. Каждый цикл состоит из трех основных этапов:

- Денатурация: Образцы нагреваются до высокой температуры (обычно около 95 °С), чтобы разделить двухцепочечную ДНК (или одноцепочечную РНК) на отдельные цепи.

- Отжиг праймеров: Температура снижается до оптимального значения для специфического связывания праймеров с целевой последовательностью ДНК (или РНК). Это позволяет праймерам присоединиться к начальным участкам целевой последовательности.

- Экстензия: Температура повышается до оптимального значения для активности термостабильной ДНК-полимеразы, которая синтезирует новые комплементарные цепи ДНК (или РНК) на основе праймеров. В процессе экстензии флуоресцентные зонды, если они присутствуют, связываются с амплифицированной ДНК (или РНК) и испускают свет.

3. Мониторинг амплификации: во время каждого цикла амплификации флуоресценция измеряется и записывается. Это позволяет отслеживать количество амплифицированной ДНК (или РНК) на каждом цикле и строить кинетическую кривую реакции.

4. Анализ данных: после завершения реакции ПЦР в реальном времени, полученные данные анализируются с использованием специального программного обеспечения. Это позволяет определить количество исходного материала, оценить его концентрацию и проанализировать результаты экспрессии генов или наличие конкретных мутаций или инфекций.

Стадии ПЦР в реальном времени могут незначительно различаться в зависимости от используемого протокола и оборудования, но общий принцип остается примерно одинаковым.

Метод ПЦР широко используется в молекулярной биологии и диагностике. Однако, есть несколько причин, по которым ПЦР может быть редко применяется для диагностики:

1. Сложность и дороговизна: ПЦР требует специализированного оборудования, реагентов и навыков для проведения анализа. Это может быть дорогостоящим и сложным для использования в некоторых лабораториях или клинических условиях.

2. **Время выполнения:** ПЦР обычно требует нескольких часов на проведение анализа, включая подготовку образцов, амплификацию ДНК и анализ результатов. В сравнении с другими методами диагностики, которые могут дать быстрый результат, ПЦР может быть менее привлекательным в некоторых ситуациях.

3. **Специфичность:** ПЦР основана на специфическом связывании праймеров с целевой ДНК-последовательностью. Это означает, что для каждого конкретного патогена или мутации требуется разработка и оптимизация специфических праймеров. Это может быть сложным для новых или малоизученных патогенов.

4. **Ограничения в образцах:** ПЦР может быть ограничена в использовании определенных типов образцов, таких как кровь, слюна или ткани. Некоторые образцы, такие как моча или кал, могут содержать ингибиторы, которые могут помешать проведению успешной реакции ПЦР.

Несмотря на эти ограничения, ПЦР остается мощным инструментом для диагностики и исследований в молекулярной биологии. В последние годы были разработаны более быстрые и доступные методы ПЦР, такие как быстрая реальнозаместительная ПЦР (qPCR) и изотермическая амплификация ДНК (LAMP), которые помогают расширить применение этой технологии в клинической практике.

### **1.3.2 Микрочипы**

Микрочипы (также известные как микрочипы для генной экспрессии или ДНК-микрочипы) являются инструментом для анализа генной экспрессии и могут быть использованы для измерения количества микроРНК.

Микрочипы для генной экспрессии содержат тысячи или даже миллионы коротких одноцепочечных фрагментов ДНК, представляющих гены или их

участки. При анализе образца РНК с использованием микрочипов происходит следующий процесс:

1. Извлечение РНК: сначала из образца извлекается общая РНК, включая микроРНК.

2. Подготовка меток: РНК маркируется флуоресцентными метками, что позволяет определить количество каждой микроРНК.

3. Гибридизация: Меткированные РНК помещаются на поверхность микрочипа, где они гибридизируются с комплементарными последовательностями на чипе.

4. Сканирование: после этого чип сканируется для обнаружения флуоресцентных сигналов, отражающих количество микроРНК, связанных с каждой последовательностью на чипе.

5. Анализ данных: Полученные данные анализируются с помощью специального программного обеспечения для определения уровня экспрессии каждой микроРНК.

Таким образом, микрочипы для генной экспрессии позволяют одновременно измерять уровень экспрессии тысяч микроРНК, что является важным инструментом для понимания биологических процессов, связанных с регуляцией генной экспрессии.

Этот метод предполагает возможность проведения комбинаторного анализа между микроРНК и экспрессией генов на одном образце, что позволяет изучать функцию микроРНК и целевых генов. Принцип этого метода основан на обратной гибридизации в твёрдой фазе. Зонды ковалентно связаны с твердым носителем, в то время как микроРНК маркируются и присутствуют в жидкой фазе. Для микроРНК из-за их короткой последовательности нуклеотидов трудно стандартизировать температуры плавления. Эта проблема была решена на некоторых платформах (Exiqon) с использованием модифицированных ядер или LNA (Locked Nucleic Acid), которые включены в зонды гибридизации. Соответствующий выбор LNA уменьшает разницу в температуре плавления

между каждым зондом и обеспечивает отличную спецификацию. Более того, благодаря включению LNA в зонды можно дифференцировать микроРНК с очень похожими последовательностями. Однако эффективность экстракции микроРНК из биологических жидкостей намного ниже, чем эффективность, полученная из клеток или тканей, а микрочипы на самом деле не представляют собой метод количественного анализа. Поэтому микрочипы следует использовать для первоначального скрининга, за которым должна следовать индивидуальная валидация интересующих микроРНК с помощью qRT-PCR.

Микрочипы находят широкое применение в медицине и здравоохранении. Вот несколько примеров заболеваний, для которых уже созданы микрочипы:

1. Диабет: существуют микрочипы, которые могут непрерывно отслеживать уровень глюкозы в крови у пациентов с диабетом. Эти устройства могут помочь пациентам контролировать свой сахар и предотвращать опасные колебания.

2. Сердечно-сосудистые заболевания: Микрочипы используются для мониторинга сердечной деятельности, измерения артериального давления, а также для предупреждения о возможных сердечных приступах [25].

3. Нейрологические заболевания: для некоторых нейрологических заболеваний, таких как болезнь Паркинсона или эпилепсия, разрабатываются имплантируемые микрочипы, которые могут помочь в управлении симптомами и поддержании качества жизни пациента [41].

4. Рак: Микрочипы могут использоваться для точного диагностирования рака, мониторинга эффективности лечения и предотвращения рецидивов [37].

5. Хронические заболевания: для пациентов с хроническими заболеваниями, такими как астма или артрит, создаются микрочипы, которые помогают отслеживать симптомы, принимать лекарства вовремя и поддерживать своё здоровье.

Это лишь небольшой список примеров. Использование микрочипов в медицине продолжает развиваться, и новые технологии постоянно появляются

для более эффективного диагностирования, лечения и мониторинга различных заболеваний.

### 1.3.3 Биосенсоры

Биосенсоры – это устройства, используемые для обнаружения биологических молекул или анализа биологических процессов с помощью биохимических методов. Они могут быть использованы для измерения концентрации различных молекул, в частности микроРНК (маленькие РНК-молекулы, играющие важную роль в регуляции генной экспрессии).

Для количественного измерения микроРНК в плазме часто используют биосенсоры, основанные на принципе гибридизации. Этот метод основан на спаривании комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот. Биосенсоры для микроРНК обычно содержат зонды, которые специфически связываются с целевыми микроРНК. Когда целевая микроРНК связывается с зондом, это приводит к изменению какого-либо параметра (например, изменению электрического сигнала), который можно измерить и использовать для количественной оценки концентрации микроРНК.

Такие биосенсоры обычно имеют высокую чувствительность и специфичность, что позволяет точно измерять концентрацию микроРНК в опытных образцах. Это может быть полезным для диагностики различных заболеваний, таких как рак или сердечно-сосудистые заболевания, где изменения уровня определенных микроРНК могут служить индикатором патологических процессов [39].

В современной медицине существует несколько типов биосенсоров, которые используются для различных целей. Вот некоторые из них:

1. Электрохимические биосенсоры: Эти биосенсоры измеряют изменения электрических свойств биологического образца. Они обычно используются для измерения концентрации определенных молекул в крови или других жидкостях.

Например, глюкометры, используемые для измерения уровня глюкозы в крови, являются формой электрохимического биосенсора.

2. Оптические биосенсоры: Эти биосенсоры используют световые сигналы для измерения биологических параметров. Они могут быть основаны на флуоресценции, поглощении света или поверхностном плазмонном резонансе. Оптические биосенсоры широко применяются в исследованиях и диагностике различных заболеваний.

3. Пьезоэлектрические биосенсоры: Эти биосенсоры измеряют изменения в механическом напряжении, вызванном взаимодействием анализируемого образца с поверхностью биосенсора. Они могут быть использованы для обнаружения определенных молекул, таких как протеины или вирусы.

4. Иммуносенсоры: это тип биосенсоров, основанный на взаимодействии антител с антигенами. Иммуносенсоры используются для обнаружения и измерения концентрации различных биомолекул, таких как антигены, антитела или иммунные комплексы.

5. Генетические биосенсоры: Эти биосенсоры используются для обнаружения и измерения генетической информации, такой как ДНК или РНК. Они могут быть использованы для диагностики генетических заболеваний, идентификации определенных генов или мониторинга экспрессии генов.

Это лишь несколько примеров типов биосенсоров, которые используются в современной медицине. Каждый тип имеет свои преимущества и может быть применен к различным медицинским задачам, таким как диагностика заболеваний, мониторинг терапии или исследования в области биологии и медицины.

#### **1.4 Сшивающая агрегация наночастиц золота**

Метод сшивающей агрегации наночастиц золота (англ. "Cross-linking gold nanoparticles aggregation") является методом, который используется для детекции биологических молекул. Принцип этого метода основан на изменении

оптических свойств золотых наночастиц при их агрегации и был описан Aghil Esmaeili-bandbon и др [40].

Золотые наночастицы обладают уникальными оптическими свойствами из-за явления, называемого плазмонным резонансом. При отдельном расположении золотых наночастиц они могут иметь определенный цвет, который обусловлен их размером и формой. Этот цвет связан с колебаниями электронов в наночастицах под воздействием света.

Когда золотые наночастицы начинают агрегироваться (то есть объединяться в более крупные структуры), происходят изменения в оптических свойствах системы. При агрегации расстояние между наночастицами уменьшается, что приводит к изменению плазмонного резонанса и, как следствие, к изменению цвета, который мы визуальнo наблюдаем.

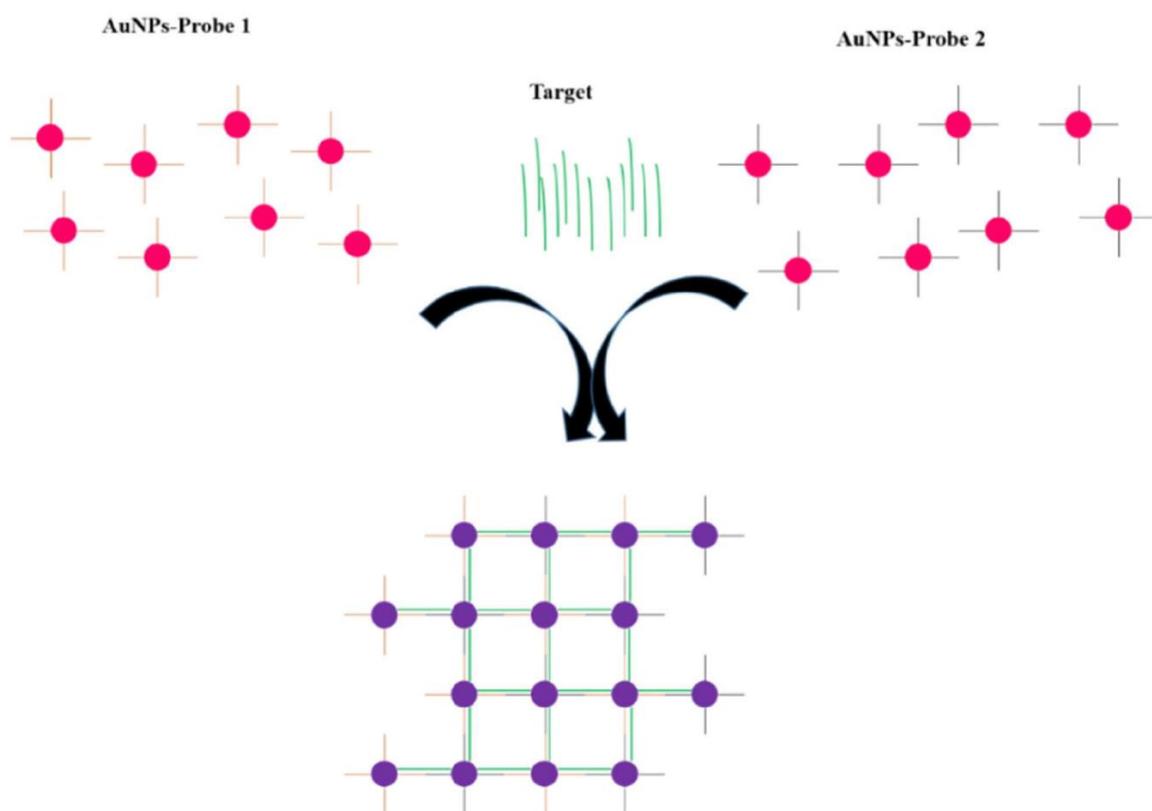


Рисунок 3 – Схема агрегации наночастиц золота.

Процесс сшивающей агрегации золотых наночастиц может быть использован для детекции биологических молекул, таких как ДНК или

протеины. Например, если в растворе присутствует целевая молекула, специфически связывающая золотые наночастицами, это приводит к их агрегации. Изменение цвета раствора можно визуальнo наблюдать или измерять при помощи спектрофотометра.

Этот метод имеет высокую чувствительность и может быть использован для различных биохимических анализов. Также он может быть применен в диагностике различных заболеваний и медицинских исследованиях благодаря своей способности к высокочувствительному обнаружению биомаркеров.

### **1.5 Золотые наночастицы и методы их получения**

Золотые наночастицы представляют собой крошечные частицы золота размером от нескольких до нескольких сотен нанометров [34]. Они обладают уникальными оптическими, электрическими и каталитическими свойствами благодаря их малому размеру и большой поверхностной области. Некоторые из основных свойств золотых наночастиц:

1. Плазмонный резонанс: Золотые наночастицы способны к плазмонному резонансу, что означает, что они могут колебаться в ответ на электромагнитное излучение определенной длины волны. Это свойство используется, например, для изменения цвета раствора при агрегации наночастиц.

2. Каталитическая активность: Золотые наночастицы обладают высокой каталитической активностью, что делает их полезными для различных химических реакций, включая окисление-восстановление и другие процессы.

3. Биосовместимость: Золотые наночастицы обычно считаются биосовместимыми, что означает, что их можно использовать в биологических системах без значительного токсического воздействия.

4. Большая поверхность: из-за их большой поверхности золотые наночастицы могут взаимодействовать с молекулами на большой своей поверхности, что делает их полезными для различных приложений в биомедицине, датчиках и других областях.

Золотые наночастицы широко используются в научных исследованиях, медицине, катализе и других областях благодаря их уникальным свойствам и возможностям для разработки новых технологий.

Существует несколько методов получения наночастиц золота, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

1. Метод гидродинамической кавитации. Этот метод включает использование гидродинамической кавитации для создания условий высокого давления и температуры, что способствует образованию наночастиц.

2. Метод термического разложения. При этом методе золото может быть получено путем разложения соединений золота при высоких температурах.

3. Методы микроэлектроники. Золотые наночастицы также могут быть получены с использованием методов микроэлектроники, таких как напыление или физическое осаждение золота на подложку.

4. Химическое восстановление. Этот метод включает восстановление золота из его солей и кислот с использованием химических стабилизаторов. К этой категории относится цитратный метод синтеза золотых наночастиц также известен как метод Туркевича, который стал одним из наиболее широко используемых методов получения золотых наночастиц. В этом методе золотые наночастицы синтезируются путем восстановления золотохлористоводородной кислоты ( $\text{HAuCl}_4$ ) в присутствии цитрата натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ). Сначала происходит восстановление примерно 30%  $\text{HAuCl}_4$ . Затем восстановление резко замедляется, и происходит конденсация золота с образованием очень маленьких частиц (зародышей). Такие частицы могут образовывать крупные, но нестабильные агрегаты, что обозначают термином «коагуляция». Золь при этом приобретает синюю окраску. Частицы, входящие в агрегаты, постепенно укрупняются и, по мере разрушения больших агрегатов становятся центрами дальнейшего быстрого восстановления (коалесценция зародышей). При достижении зародышами определённого критического размера образуется устойчивый золь, имеющий красную окраску. Значительным преимуществом метода является возможность предсказать размеры наночастиц в зависимости от

количества добавляемого стабилизатора по формуле  $d = 38.2 \sqrt{70.855}$ . Цитратный метод обладает простотой, надежностью и хорошей контролируемостью размера и формы наночастиц, поэтому он широко применяется в научных и промышленных исследованиях.

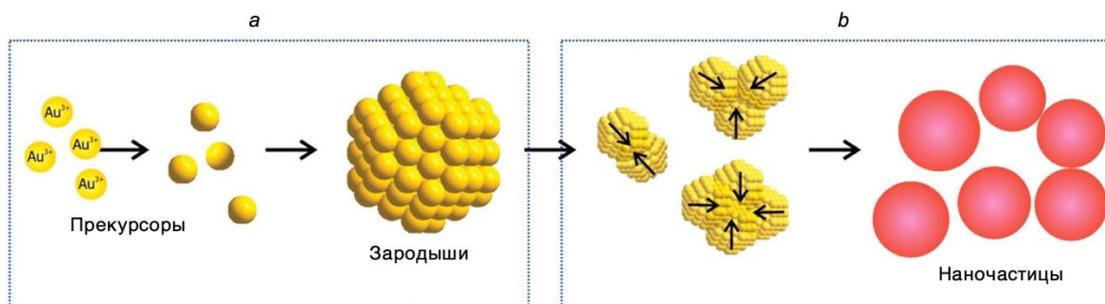


Рисунок 4 - Схема формирования наночастиц золота.

а-восстановление и нуклеация

б – коалесценция зародышей

### 1.6 Анализ динамического светорассеивания

Динамическое светорассеивание (DLS) — это метод анализа, используемый для определения размеров частиц в дисперсной системе. Принцип работы DLS основан на измерении изменений в рассеянном свете, вызванных тепловыми движениями частиц.

В процессе измерения применяется монохроматический лазерный свет, который направляется на образец. Частицы в образце начинают колебаться из-за теплового движения, что приводит к изменениям в рассеянии света. Детекторы регистрируют эти изменения и анализируют их для определения размеров и размерного распределения частиц в образце.

DLS широко используется в различных областях, таких как коллоидная химия, биология, фармацевтика и нанотехнологии, для определения размеров наночастиц, молекул белков и других биологических объектов. Этот метод позволяет быстро и неинвазивно оценить размеры частиц в жидких средах без необходимости предварительной подготовки образца.

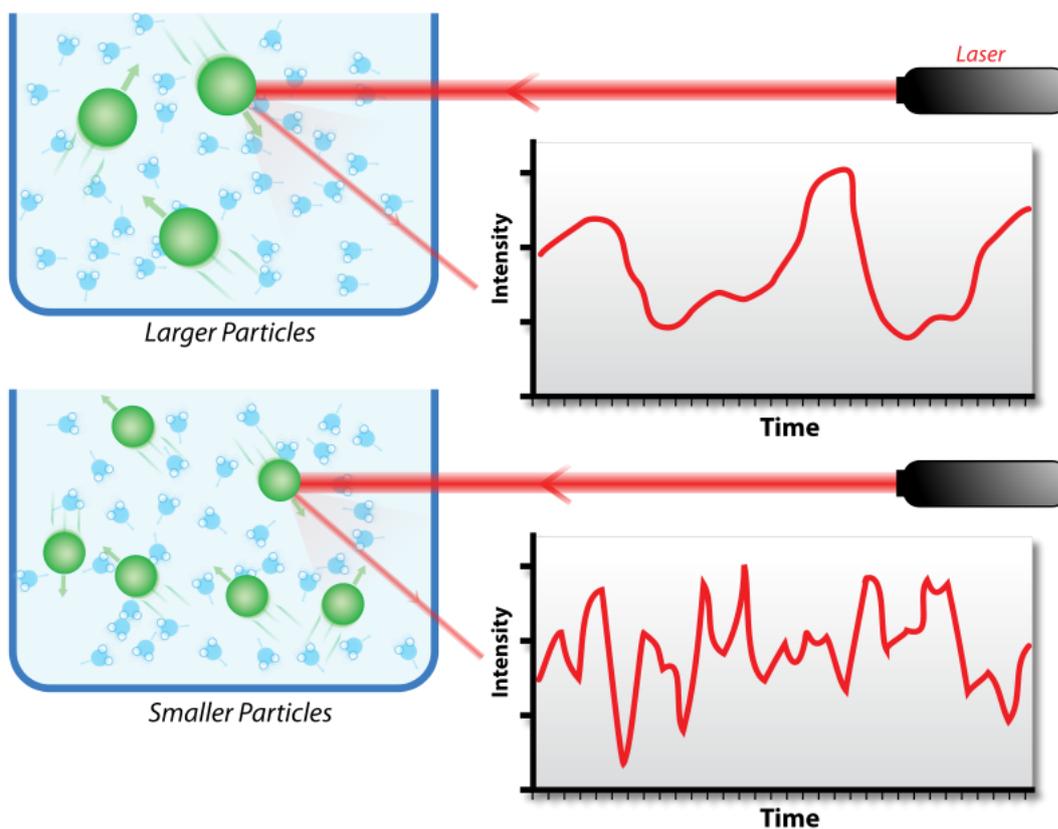


Рисунок 5 - Метод динамического светорассеивания (DLS).

Для анализа золотых наночастиц методом динамического светорассеивания (DLS) обычно используются следующие шаги:

1. Подготовка образца. Золотые наночастицы должны быть равномерно распределены в жидкой среде. Образец должен быть чистым и стабильным для точных измерений.

2. Измерение. Образец помещается в специальную кювету, которая затем помещается в прибор для DLS. Лазерное излучение направляется на образец, и детекторы регистрируют рассеянный свет.

3. Анализ данных. Данные о рассеянии света анализируются с помощью компьютерной программы. Изменения в рассеянии света, вызванные тепловыми движениями золотых наночастиц, позволяют определить их размеры.

4. Интерпретация результатов. По данным DLS можно определить средний размер золотых наночастиц, их размерное распределение, а также другие параметры, такие как полидисперсность (разнообразие размеров частиц).

Этот метод позволяет быстро и эффективно определить размеры золотых наночастиц без необходимости сложной подготовки образца. Результаты анализа могут быть полезными при исследовании свойств наночастиц для различных приложений, таких как катализ, биомедицинская диагностика и другие области науки и технологий.

Для анализа золотых наночастиц методом динамического светорассеивания (DLS) используются специализированные приборы, называемые динамическими светорассеивателями [51]. Некоторые из наиболее распространенных приборов для проведения анализа методом DLS включают:

1. Zetasizer. Это один из наиболее известных и широко используемых приборов для анализа динамического светорассеивания. Он производится компанией Malvern Panalytical и предлагает широкие возможности для измерения размеров частиц и их распределения.

2. NanoSight. Еще один популярный прибор, который используется для анализа наночастиц методом трекинга света (NTA). Он также способен измерять размеры частиц и их концентрацию в образце.

3. Brookhaven Instruments. Компания Brookhaven Instruments также производит приборы для анализа динамического светорассеивания и других методов анализа наночастиц.

4. Horiba Scientific. Еще один производитель приборов, предлагающий решения для анализа наночастиц, включая метод DLS.

Эти и другие приборы способны проводить анализ золотых наночастиц методом DLS и предоставлять информацию о размерах частиц, их распределении, полидисперсности и других параметрах. Каждый из них имеет свои особенности и возможности, поэтому выбор конкретного прибора может зависеть от потребностей и целей конкретного исследования.

## **1.7 Методы конъюгации золотых наночастиц с ДНК**

Существует несколько методов конъюгации золотых наночастиц (НЧ) с ДНК.

1. Метод адсорбции: В этом методе ДНК молекулы адсорбируются на поверхность золотых наночастиц. Для этого добавляют раствор ДНК к раствору золотых наночастиц и инкубируют при комнатной температуре. ДНК молекулы образуют двойную спираль на поверхности наночастиц благодаря взаимодействию между основаниями ДНК и поверхностью золотых наночастиц. Это приводит к конъюгации наночастиц с ДНК.

2. Метод функционализации: В этом методе ДНК молекулы функционализируются группами, которые могут связываться с поверхностью золотых наночастиц. Например, можно использовать тиоловые группы, которые образуют ковалентные связи с золотом. Сначала ДНК молекулы модифицируются, добавляя тиоловые группы к их концам. Затем золотые наночастицы функционализируются соединениями, содержащими группы, способные связываться с тиоловыми группами ДНК. При смешивании функционализированных ДНК и наночастиц происходит образование ковалентных связей между тиоловыми группами и поверхностью золотых наночастиц, что приводит к конъюгации.

Тиольные группы (SH) имеют способность к ковалентному взаимодействию с поверхностью золота благодаря образованию координационной химической связи между атомом серы и атомами золота. Это взаимодействие называется хемисорбцией и происходит из-за особенностей электронной структуры золота и серы.

Золото имеет высокую аффинность к тиоловым группам из-за следующих причин.

1. Электронная структура золота: у золота есть свободные d-электроны, что делает его поверхность химически активной и способной к образованию ковалентных связей с другими атомами.

2. Способность серы к образованию координационных связей: атом серы обладает свободной парой электронов на атоме, которые могут образовать координационную связь с золотом.

3. Стабильность образующейся связи: ковалентная связь между атомом серы и атомами золота является довольно стабильной, что способствует прочному сращиванию тиоловых групп с поверхностью золотых наночастиц.

Именно эти факторы делают тиольные группы привлекательными для использования в функционализации золотых наночастиц и создания устойчивых конъюгатов с различными молекулами, такими как ДНК, белки и другие биомолекулы.

Также для конъюгации используют следующие функциональные группы:

1. Карбоксильные группы (-COOH): карбоксильные группы также могут использоваться для соединения с золотыми наночастицами. Они могут образовывать связи с поверхностью золота через кислород и участвовать в различных химических реакциях.

2. Аминогруппы (-NH<sub>2</sub>): аминогруппы могут также использоваться для функционализации золотых наночастиц. Они могут образовывать координационные связи с поверхностью золота и обеспечивать дополнительные возможности для модификации наночастиц.

Оба этих метода позволяют конъюгировать золотые наночастицы с ДНК и создавать структуры, которые могут использоваться в различных приложениях, включая биомедицинские и научные исследования [52].

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Методика синтеза золотых наночастиц

#### Материалы и оборудование

- Тетрахлороводородная кислота  $\text{HAuCl}_4$  (Silver Salt, Россия)
- Цитрат натрия  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$
- Дистиллированная вода
- Лимонная кислота  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- Мерный цилиндр
- Термостойкий стакан 500 мл
- Плитка с магнитной мешалкой
- ПЦР-бокс
- Пробирки 1000 мкл (Eppendorf, Германия)
- Автоматические дозаторы
- Наконечники для автоматических дозаторов
- Parafilm M (Amcor, Австралия)

Для синтеза частиц был взят стандартный протокол синтеза наночастиц в диапазоне 5-30 нм. Синтез проводился методом Туркевича. К водному  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М раствору  $\text{HAuCl}_4$ , доведённому до кипения по каплям приливали 2 мл буферной смеси, содержащей 20 мг  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  и 1 мг  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ . После этого температура раствора поддерживалась на прежнем уровне ещё 5 минут, реакция протекала при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Сразу после добавления  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  наблюдалось почернение раствора, после чего он медленно становился бардовым и затем красным (Рис 3). Далее раствор остывал при комнатной температуре в течение 1 часа и хранился в холодильнике. Для определения диаметра наночастиц был проведён анализ динамического светорассеивания.

## 2.2 Методика конъюгации ДНК-зондов с золотыми наночастицами

### Материалы и оборудование

- Дистиллированная вода
- Хлорид натрия NaCl
- Мерный цилиндр
- Vortex
- стакан 500 мл
- Центрифуга
- ПЦР-бокс
- Пробирки 1000 мкл (Eppendorf, Германия)
- Автоматические дозаторы
- Наконечники для автоматических дозаторов
- Parafilm M (Amscor, Австралия)
- SDS (PanReac AppliChem, Германия)
- Tris-буфер 1М (Medigen)

Конъюгация проводилась методом salt aging. К 3 мл золотых наночастиц в концентрации 45 мкг/мл было добавлено 250 мкл ДНК-зондов в концентрации 100 рМ. Раствор инкубировался 1 час при комнатной температуре. После этого в раствор был добавлен 0,1 % SDS и 10 mM Tris-HCl в финальной концентрации. Раствор был инкубирован в течении часа при комнатной температуре. После чего с промежутком в 20 минут в раствор был добавлен NaCl с последовательным увеличением молярности раствора (0,2 М, 0,4 М, 0,7 М). После этого дважды проводилась центрифугирование (30 мин; 14 000 об/мин). Далее супернатант был отобран и частицы были ресуспендированы в буфере для ресуспендирования (0,7 М NaCl, 0,1% SDS, 10mM Tris). Далее 500 мкл раствора ЗНЧ+Зонд №1 было смешано с 500 мкл раствора ЗНЧ+Зонд №2.

## 2.3 Проведение проверки конъюгации ДНК-зондов с золотыми наночастицами

### Материалы и оборудование

- Дистиллированная вода
- Мерный цилиндр
- Vortex
- Стакан 500 мл
- Хлорид натрия NaCl
- Центрифуга
- ПЦР-бокс
- Пробирки 1000 мкл (Eppendorf, Германия)
- Parafilm M (Amcor, Австралия)

Методика проверки основана на свойстве золотых наночастиц агрегировать (образовывать агломераты) в присутствии солей. Однако при наличии стабилизирующих молекул на поверхности наночастиц (например ДНК), агрегация не наступает. Ещё одним важным свойством золотых наночастиц является изменение цвета раствора с красного на синий при агрегации наночастиц. Благодаря этому свойству, можно наглядно увидеть результаты эксперимента и сделать соответствующие выводы.

Сначала были приготовлены 4 контрольные пробирки. Они содержали раствор золотых наночастиц. Далее во все пробирки был прилит одинаковый объём NaCl. При добавлении соли, наночастицы должны агрегировать и приобретать голубой оттенок. Если тот же самый объём NaCl был прилить в пробирки, содержащие золотые наночастицы с ДНК на поверхности, цвет раствора должен остаться тем же.

## **2.4 Методика подготовки плазмы крови**

Забор крови пациентов производился из кубитальной вены. Забор осуществлялся в объёме 10 мл в вакуумные пробирки «IMPROVACUTER» (Guangzhou Improve Medical Instruments, Китай), содержащие 0.5 М раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты с полным соблюдением асептических условий. Для отделения фракции плазмы проводилось центрифугирование вакутейнеров с кровью при 515g в течение 10 минут. После этого верхняя фаза переносилась в чистые пробирки типа эппендорф на 1,5–2 мл и подвергалась следующему этапу центрифугирования при 13400 об/мин. В течение 10 минут. Супернатант переносился в чистые пробирки типа эппендорф на 0,6 мл по 320 мкл в каждый. Отобранная плазма хранилась в низкотемпературном морозильнике при  $-80^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего использования.

## **2.5 Методика проведения анализа содержания микроРНК**

К 250 мкл смеси зондов (ЗНЧ+Зонд №1 + ЗНЧ+Зонд №2) добавлялось 20 мкл раствора плазмы, содержащей микроРНК. Далее проводилась инкубация при температуре  $80^{\circ}\text{C}$  в течении 5 минут и при температуре  $60^{\circ}\text{C}$  в течении 5 минут. Далее образцы остывали 5 минут при комнатной температуре. Измерения проводились с помощью спектрофотометра CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) в диапазоне длин волн 350 – 800 нм с шагом в 1 нм.

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ**

Страницы 39-46 изъяты в связи с авторским правом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были подобраны нуклеотидные последовательности ДНК-зондов, способные комплиментарно связываться с микроРНК-134.

Методом Туркевича были получены золотые наночастицы диаметром 20 нм.

Была проведена конъюгация полученных наночастиц с ДНК-зондами.

Были подобраны оптимальные условия для проведения аналитической реакции конъюгантов и плазмы крови: время и температура инкубации, оптимальный объём вносимого образца плазмы, концентрация конъюгантов.

С помощью спектрального анализа было установлено, что сдвиги пика поглощения аналитического раствора (в диапазоне 350-800 нм) обратно пропорциональны количеству микроРНК в пробе.

По полученным значениям сдвигов пика поглощения аналитических растворов было проведено сравнение концентраций микроРНК-134 в плазме крови у пациентов контрольной группы и с установленным диагнозом височной эпилепсии.

У пациентов с установленным диагнозом ВЭ значение концентрации микроРНК в плазме было менее 1000 нМ, у пациентов контрольной группы – больше 1000 нМ.

Пороговым значением содержания микроРНК-134 для диагностики височной эпилепсии оказалось значение около 1000 нМ.

Метод ПЦР для определения содержания микроРНК-134 в плазме крови остаётся одним из наиболее чувствительных методов диагностики височной эпилепсии. Разработанный нами метод определения содержания микроРНК-134 в плазме крови с использованием биосенсора на основе золотых наночастиц также показывает достаточную чувствительность для постановки диагноза ВЭ. Он является быстрым и простым в реализации.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

miR – микроРНК

ЗНЧ – золотые наночастицы

ВЭ – височная эпилепсия

ДНК (DNA) – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ДЛС – динамическое светорассеивание

п.о. – пары оснований

b.p. – base pairs

УФ – ультрафиолетовое излучение

РНКазы - рибонуклеазы

hnRNP - гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды

ЭЭГ - электроэнцефалография

МРТ - магнитно-резонансная томография

ГТФазы - семейство ферментов гидролаз, которые связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. International League Against Epilepsy. Официальный сайт <https://www.ilae.org/>
2. Yakimov A, Timechko E et al. MicroRNAs as Biomarkers of Surgical Outcome in Mesial Temporal Lobe Epilepsy: A Systematic Review // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24(6). – С. 5694.
3. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // Cell. – 1993. – Т. 75(5). – С. 843-54.
4. Chim S. et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma // Clinical Chemistry. – 2008. – Т. 54. – С. 482-490.
5. Chen X. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // Cell. – 2008. – Т. 18 (10). – С. 997–1006.
6. Mitchell P.S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // PNAS USA. – 2008. – Т. 105(30). – С. 10513–10528.
7. Кубаныч А.А. и др. Циркулирующие микроРНК как потенциальные биомаркеры хронической болезни почек // Терапевтический архив. – 2019. – Т. 91(6). – С. 133–138.
8. Ha M, Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2014. – Т. 15. – С. 509-524.
9. Bartel D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function // Cell. – 2004. – Т. 116(2). – С. 281-297.
10. Bushati N., Cohen S.M. microRNA functions // Annual Review of Cell and Developmental Biology. – 2007. – Т. 23. – С. 175-205.
11. Lawrie C.H. et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma // British Journal of Haematology. – 2008. – Т. 141. – С. 672-675.

12. Valadi H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nature Cell Biology*. – 2007. – Т. 9. – С. 654-659.
13. Arroyo J.D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2011. – Т. 108. – С. 5003-5008.
14. Vickers K.C. et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins // *Nature Cell Biology*. – 2011. – Т. 13. – С. 423-433.
15. Yang W. et al. The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis // *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. – 2011. – Т. 3(2). – С. 140-155.
16. Creemers E.E., Tijssen A.J., Pinto Y.M.. Circulating microRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? // *Circulation Research*. – 2012. – Т. 110(3). – С. 483-95.
17. Lu J, Clark AG. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression // *Genome Research*. – 2012. – Т. 22(7). – С. 1243-1254.
18. МикроРНК: малые молекулы с большим значением В.Н. Аушев ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» *Клин. онкогематол.* 2015; 8(1): 1–12
19. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework // *Clinical pharmacology and therapeutics* – 2001. – Т. 69 (3). – С. 89–95.
20. Hess S., Ozoux M.L., Gerl M. Biomarker Definition and Validation During Drug Development // *Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology*. – 2011. – С. 223–244.
21. Dancey J.E. et al. Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2010. – Т. 16 (6). – С. 1745–1755.

22. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations // *NeuroRx*. – 2004. – No. 1. – С. 182–188.
23. Комарова Жанна. Биомаркеры и их ценность // *Наука и инновации*. – 2019. – No. 4 (194). – С. 4–8.
24. База данных MirTarBase.  
[https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase\\_2022/php/index.php](https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php)  
Ссылка на научную публикацию miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA–target interactions.
25. Heinonen T.M. et al. Cardiovascular biomarkers and surrogate end points: key initiatives and clinical trial challenges // *Expert review of cardiovascular therapy*. – 2012. – Т. 10(8). – С. 989–994.
26. Anderson D.C., Kodukula K. Biomarkers in pharmacology and drug discovery // *Biochemical pharmacology*. – 2014. – Т. 87(1). – С. 172–188.
27. Antagomirs targeting microRNA – 134 increase hippocampal pyramidal neuron spine volume in vivo and protect against pilocarpine-induced status epilepticus / *Brain structure and function* – 2015.
28. Calin G.A. et al. Frequent deletions and downregulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2002. – Т. 99(24). – С. 15524- 15529.
29. Ye J, et al. miRNA-27b targets vascular endothelial growth factor C to inhibit tumor progression and angiogenesis in colorectal cancer. *PLoS One*. – 2013. – Т. 8(4). – С. 60687.
30. Hur K. et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis // *Gut*. – 2013. – Т. 62. – С. 1315-1326.
31. Yu Y. et al. MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGF\_R2) in colon cancer cells // *Carcinogenesis*. – 2012. – Т. 33. – С. 68-76.

32. Izzotti A. et al. Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: Applicability in cancer diagnosis and prevention // *American Journal of Cancer Research*. – 2016. – Т. 6(7). – С. 1461- 1493.
33. Carpelan-Holmström M. et al. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers // *Anticancer Research*. – 2002. – Т. 22. – С. 2311-2316.
34. Золотые наночастицы. Синтез, свойства, биомедицинское применение. П. М. Бычковский, А. А. Кладиев // *Российский биотерапевтический журнал* – 2011.
35. Sturgeon C.M. et al. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clinical Chemistry*. – 2008. – Т. 54. – С. 11-79.
36. Ferlay, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods // *International Journal Cancer*. – 2019. – Т. 144. – С. 1941–1953.
37. Wu K-L et al. The Roles of MicroRNA in Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Т. 20(7). – С. 1611
38. Bishop, J.A. et al. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach // *Clinical Cancer Research*. – 2010. – Т. 16. – С. 610–619.
39. Lebanony, D. et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Т. 27. – С. 2030–2037.
40. Cross-linking gold nanoparticles aggregation method based on localised surface plasmon resonance for quantitative detection of miR-155, Aghil Esmaeili-bandboni, Seyed Mohammad Amini // *IET Nanobiotechnology*-2018.
41. Lujambio, A. et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells // *Cancer Research*. – 2007. – Т. 67. – С. 1424– 1429.

42. Zhang, Y.K. et al. miRNAs expression profiling to distinguish lung squamous-cell carcinoma from adenocarcinoma subtypes // *Cancer Research*. – 2012. – T. 138. – C. 1641–1650.
43. Nishikawa, E. et al. miR-375 Is Activated by ASH1 and Inhibits YAP1 in a Lineage-Dependent Manner in Lung Cancer // *Cancer Research*. – 2011. – T. 71. – C. 6165–6173.
44. Demes, M. et al. Differential miRNA-Expression as an Adjunctive Diagnostic Tool in Neuroendocrine Tumors of the Lung // *Cancers*. – 2016. – T. 8. – C. 38.
45. Gilad, S. et al. Classification of the Four Main Types of Lung Cancer Using a MicroRNA-Based Diagnostic Assay // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2012. – T. 14. – C. 510–517.
46. Xiaoman Li et al MicroRNA-9 and breast cancer // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2020. – T. 122. – C. 109687.
47. Gravgaard, M.B. et al. The miRNA-200 family and miRNA-9 exhibit differential expression in primary versus corresponding metastatic tissue in breast cancer // *Breast Cancer Research*. – 2012. – T. 134(1). – C. 207-217
48. J.Ferlay et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012 // *European Journal of Cancer*. – 2013.
49. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. Shibin Qu, Xisheng Yang, Xiaolei Li, Jianlin Wang, Yuan Gao, Runze Shang, Wei Sun, Kefeng Dou, Haimin Li // *Cancer letters* – 2015.
50. F.H. Schroder et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up // *Lancet*. – 2014.
51. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Jord Stefeld, Sean A. McKenna, Trushar R. Pate // *Biophysical Reviews* – 2016.
52. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы, Л. А. Дыкман, Н. Г. Хлебцов, учреждение Российской

академии наук Институт оохимии и физиологии и микроорганизмов  
//Acta Naturae (русскоязычная версия) – 2011.

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биоинженерии и биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

 Т.Г. Волова

« 21 » июня 2024 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Использование биосенсора на основе золотых наночастиц для диагностики височной эпилепсии по концентрации микроРНК, выделенной из плазмы

Руководитель



Доцент, к.б.н.

О.А. Гусейнов

Выпускник

 12.06.24

С.А. Дмитриенко

Красноярск 2024