

На правах рукописи

ДУБЫНИНА АННА ВЛАДИМИРОВНА

**АДРЕСНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ  
БИОКОНЬЮГАТАМИ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ**

03.01.04 - биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» и Институте Физики Сибирского отделения Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

д.б.н., профессор **Замай Татьяна Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

**Гуляева Людмила Федоровна**, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики"

**Рябченко Александр Владимирович**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт биохимии"

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (г. Новосибирск)

Защита состоится « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_\_ часов

на заседании диссертационного совета Д 001.034.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ биохимии и на сайте <http://niibch.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Русских Галина Сергеевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Важнейшей проблемой терапии онкологических заболеваний, наряду с проблемой несвоевременной диагностики, до настоящего времени остается высокая токсичность и низкая эффективность применяемых лекарственных препаратов, поэтому разработка новых средств и технологий терапии становится одним из наиболее актуальных и востребованных направлений развития современной персонализированной медицины.

В последнее время стали разрабатываться нестандартные средства противоопухолевой терапии, основанные на нанотехнологиях, предполагающих физические способы деструкции опухоли с использованием наночастиц, обладающих уникальными свойствами. Однако недостатком таких методов в совокупности с применяемыми наночастицами стала недостаточно высокая специфичность воздействия физических факторов, вследствие чего происходило накопление наночастиц во всех тканях, а не только в опухолевых, а применение физических методов воздействия (магнитного поля и лазерного облучения) вызывало повреждение окружающих опухоль тканей.

Стало очевидным, что увеличение эффективности действия наночастиц можно достичь только адресным воздействием, что невозможно осуществить без распознающих опухоль биомолекул. В настоящее время в качестве таких биомолекул зачастую используют моноклональные антитела. Однако моноклональные антитела имеют ряд недостатков, в частности, высокую иммуногенность, нестабильность и высокую стоимость, поэтому даже в экспериментах они используются нечасто. Вследствие этого в качестве распознающих биомолекул начинают использовать олигонуклеотиды, выполняющие роль искусственных антител – аптамеров.

Аптамеры так же, как и моноклональные антитела способны связываться с высокой степенью специфичности с любыми биологическими мишенями, благодаря чему могут быть использованы в качестве средств адресной доставки к клеткам-мишеням, однако обладают рядом преимуществ, в частности, низкой иммуногенностью, малыми размерами, простотой в хранении и использовании.

Аптамеры представляют собой искусственные одноцепочечные короткие последовательности ДНК или РНК (иногда пептиды), которые благодаря своей вторичной и третичной структуре способны связываться со своими мишенями с очень высокой специфичностью (Piuk A.V. et al., 2011).

Функционально аптамеры представляют собой аналоги естественных антител. Выбор аптамеров основан на скрининге большого числа последовательностей в библиотеках *in vitro*, благодаря чему удается подобрать аптамеры с высокой специфичностью практически к любой мишени – от маленьких неорганических ионов до интактных клеток. Выбранный однажды пул аптамеров можно амплифицировать с помощью ПЦР реакции, а, зная последовательность в них нуклеотидов, химически

синтезировать с высокой чистотой любое их необходимое количество. Простота химической структуры позволяет модифицировать аптамеры с помощью любых функциональных групп для различных целей. Кроме прочего, аптамеры гораздо стабильнее антител, что делает их незаменимыми при работе с высокими температурами и экстремальными значениями pH (Piuk A.V. et al., 2011).

**Цель работы** – разработка технологии адресной деструкции злокачественных опухолей с помощью конъюгатов на основе аптамеров.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать способ доставки аптамеров к внутриклеточным мишеням.
2. Исследовать противоопухолевый эффект конъюгатов арабиногалактана с аптамерами к внутриклеточным мишеням в условиях *in vivo*.
3. Оценить способность функционализированных ДНК-аптамерами магнитных микродисков в условиях воздействия переменного магнитного поля разрушать асцитные клетки карциномы Эрлиха *in vitro* и *in vivo*.
4. Изучить способность функционализированных ДНК-аптамерами золотых наночастиц индуцировать плазмонный резонанс, способствующий развитию гипертермии и деструкции опухоли *in vitro* и *in vivo* в условиях воздействия лазера.
5. Оценить токсический эффект функционализированных ДНК-аптамерами магнитных микродисков и наночастиц золота.

### **Научная новизна**

Впервые показана способность арабиногалактана транспортировать в опухолевые клетки ДНК-аптамеры, обладающие противоопухолевым эффектом.

Впервые показана способность конъюгатов арабиногалактана с ДНК-аптамерами к внутриклеточному белку виментину подавлять рост асцитной карциномы Эрлиха.

Впервые показано, что функционализированные ДНК-аптамерами магнитные микродиски в условиях переменного магнитного поля способны осуществлять адресное разрушение опухолевых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанные технологии использования ДНК-аптамеров в качестве распознающих биомолекул с заданной специфичностью к определенным мишеням могут быть применимы для создания препаратов, обладающих противоопухолевой активностью. Разработанная технология переноса нуклеиновых кислот внутрь клетки с помощью арабиногалактана может быть использована для введения мРНК или плазмид в опухолевые и нормальные клетки.

### **Апробация результатов исследования**

Результаты исследования были представлены на международной научно-практической конференции, Волгоград (2015), международных конференциях в Нидерландах «11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society» (2015) и Франции «Aptamers in Bordeaux» (2016).

### **Степень достоверности результатов**

Результаты получены на современном оборудовании с использованием стандартизированных методик и программ.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Арабиногалактан из лиственницы сибирской способен осуществлять перенос ДНК-аптамеров и плазмиды EGFP через клеточную мембрану путем эндоцитоза.
2. Конъюгаты арабиногалактана с ДНК-аптамерами к внутриклеточному белку виментину обладают противоопухолевым эффектом в условиях *in vivo*, индуцируя апоптоз опухолевых клеток.
3. Функционализированные ДНК-аптамерами магнитные никелевые микродиски в условиях переменного магнитного поля вызывают гибель опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.
4. Функционализированные ДНК-аптамерами золотые наночастицы в условиях индуцированной лазером гипертермии стимулируют разрушение опухолевой ткани.
5. Функционализированные ДНК-аптамерами магнитные микродиски и золотые наночастицы не обладают выраженным токсическим эффектом.

### **Внедрение результатов исследования**

Методический материал по использованию ДНК-аптамеров для адресной деструкции злокачественной опухоли включен в курс лекций по биоэнергетике и биохимии для студентов Сибирского федерального университета и физиологии для студентов Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

Полученные в ходе работы ДНК-аптамеры и методики их применения для адресной деструкции опухолевых клеток используются в научно-исследовательской работе Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе, 2 статьи – в журнале, рекомендованном ВАК РФ, 1 статья – в зарубежном журнале.

### **Объем и структура диссертации**

Материал диссертации изложен на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирован 36 рисунком, 9 таблицами. Работа состоит из введения, аналитического обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и списка литературы. Список литературы состоит из 127 источников, из которых 14 российских и 113 зарубежных.

### **Личный вклад автора**

Автором было принято непосредственное участие в планировании экспериментов, лично проведены исследования и анализ полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России (Соглашение №14.607.21.0104) с использованием оборудования ЦКП Красноярского научного центра Сибирского отделения Российской Академии наук.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В работе были использованы следующие реактивы и материалы:

Буфер Хенкса (Sigma-Aldrich, USA); PBS-буфер (Sigma-Aldrich, USA); DPBS-буфер (Sigma-Aldrich, USA); маскирующая ДНК (Salmon sperm DNA) (Promega INC, USA); ДНК-аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха (Integrated DNA technologies, USA), наночастицы золота (37 нм) (Биотест, Новосибирск), никелевые магнитные микродиски, покрытые золотом (500 нм) (Институт физики полупроводников СО РАН, Новосибирск), аннексин V Alexa Fluor 488 (Invitrogen Corporation), пропидия йодид (Sigma-Aldrich). Последовательности синтетических аптамеров к асцитным клеткам (Integrated DNA technologies, USA) представлены в таблице 1, белки – кандидаты в мишени – в таблице 2.

Исследования были проведены с использованием проточного цитометра Beckman Coulter Cytomics FC 500; флуоресцентного микроскопа Olympus BX 41; спектрофотометра Nanodrop 2000 ThermoScientific, спектрофлуориметра Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (USA), двухлучевого спектрофотометра UV-3600 (Shimadzu), микроскопа AxioImager D1, флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss AxioStar plus, лазера SpectraPhysics Millennia V, инфракрасной камеры Testo 875-1i (TESTO AG, Германия) и др.

Эксперименты выполнены на белых мышах-самцах ICR массой 27-35 г, полученных из питомника ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» (п. Кольцово Новосибирской области).

Объектом исследования служили асцитные клетки карциномы Эрлиха, изолированные на 5-16 сутки после их внутрибрюшинной трансплантации в количестве 5 млн. клеток белым мышам ICR, а также асцитные клетки карциномы Эрлиха, трансплантированные в бедро для формирования солидной опухоли. Кроме того, в качестве объектов исследования

использовали гепатоциты, фибробласты, клетки почек и селезенки мышей линии ICR, клетки кумулюса, лейкоциты и эритроциты человека. Культуры фибробластов и клетки кумулюса были любезно предоставлены Центром репродуктивной медицины (Красноярск).

Таблица 1 – Последовательности синтетических ДНК-аптамеров.

№	Аптамер	Последовательность нуклеотидов
1	AS-9	СТССТСТГАСТГТААССАСГАСТГАГСТТТГГТГГГТСТГАГСТАТГТ ГСТГССТСТТСАСГАТАГГТАГТССАГААГСС
2	AS-14	СТССТСТГАСТГТААССАСГААГГТГТСТГГССТТАГТААГГСТАСАГ ССААГГГААСТГАСГАТАГГТАГТССАГААГСС
3	NAS-24	СТССТСТГАСТГТААССАСГССТГГГАСАГССАСАСГААГТГТА ГАССТСГСГГААТСТГГСАТАГГТАГТССАГААГСС
4	AS-42	СТССТСТГАСТГТААССАСГТСААТГГГТГАТАТАТГСАГГТТАСГС ТГГСТАГТТГАААГСАТАГГТАГТССАГААГСС

Таблица 2 – Аптамеры, кандидатами в мишени которых являются белки, специфичные для рака легкого и канцерогенеза в целом.

Аптамер	Белки-кандидаты в мишени аптамеров
AS-9	Филамин-А, Миозин-9 (Коловская О.С. и др., 2013)
AS-14	А-Субъединица АТФ-синтазы, фибронектин, анастеллин, легкая цепь миозина-6 (Коловская О.С. и др., 2013)
NAS-24	Виментин (Zamay T.N. et al., 2013)

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### *1. Трансфекция аптамеров в клетку с помощью арабиногалактана*

В качестве доказательных методов для исследования возможности арабиногалактана способствовать трансфекции аптамеров в клетку были использованы спектрофлуориметрия и флуоресцентная микроскопия.

Результаты применения флуоресцентной спектроскопии представлены на рисунке 1. Из рисунка видно, что после инкубации флуоресцентно меченых аптамеров с арабиногалактаном флуоресценция фибробластов, клеток кумулюса и асцитных клеток увеличилась в среднем в 1,5 раза, а флуоресценция эритроцитов при этом не изменилась. Причем инкубация клеток без арабиногалактана, но в присутствии аптамеров практически не повлияла на уровень флуоресценции. Эти данные свидетельствуют о том, что олигонуклеотиды вошли внутрь фибробластов, клеток кумулюса и асцитных клеток, но не вошли внутрь эритроцитов.

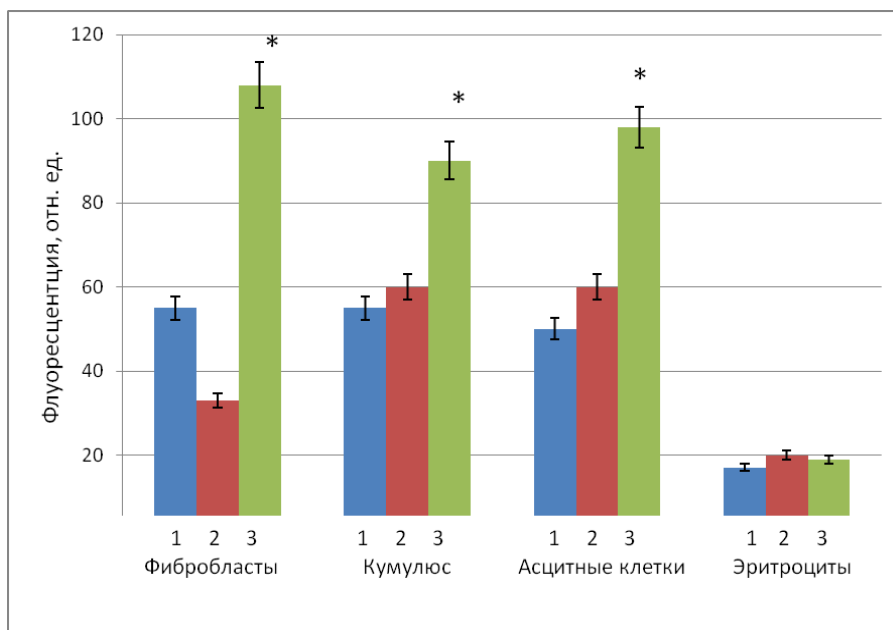


Рисунок 1 – Флуоресценция фибробластов, клеток кумулуса, асцитных клеток и эритроцитов после инкубации в присутствии: 1 – арабиногалактана; 2 – флуоресцентно меченых олигонуклеотидов; 3 – арабиногалактана и флуоресцентно меченых олигонуклеотидов.

Примечание: \* –  $P < 0,01$ .

Результаты переноса аптамеров NAS-24, меченных флуоресцентной меткой FAM, в асцитные клетки с помощью арабиногалактана представлены на рисунке 2. Хорошо видно, что в отсутствие арабиногалактана аптамеры NAS-24 в клетку не входят.

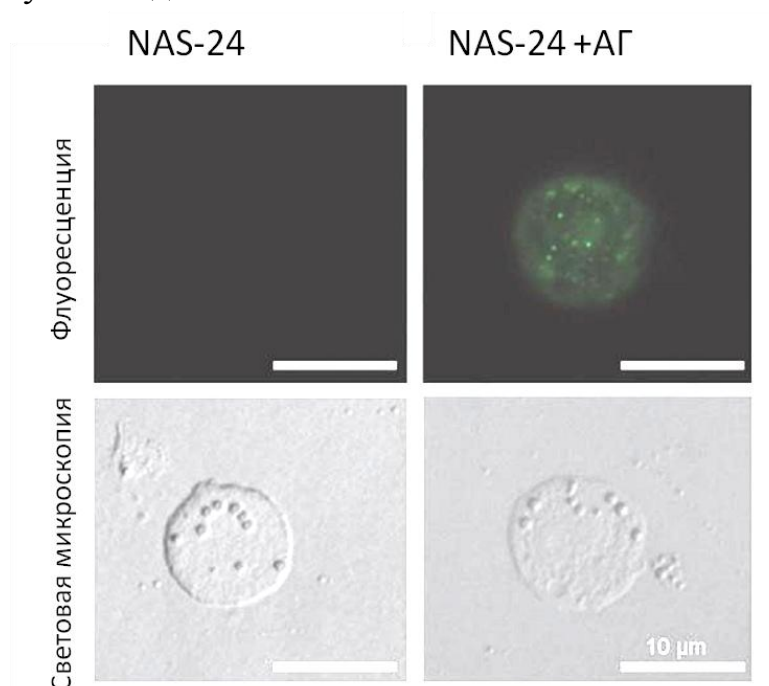


Рисунок 2 – Асцитные клетки после инкубации с аптамерами NAS-24, меченным флуоресцентной меткой FAM (слева), и комплексом аптамера с арабиногалактаном (NAS-24+АГ) (справа).



Можно предположить, что трансфекция олигонуклеотидов с помощью арабиногалктана может быть вызвана эндоцитозом с помощью асиалогликопротеинового рецептора (ASGPR), лигандом для которого является галактоза, входящая в состав арабиногалктана. ASGPR – интегральный белок плазматической мембраны, состоящий из двух субъединиц (ASGPR1 и ASGPR2). В мембране он присутствует в виде мультимерного комплекса массой 150 kDa или 95 kDa. Каждая из субъединиц (ASGPR1 и ASGPR2) содержит по 4 функциональных домена – цитозольный домен, трансмембранный домен, а примембранный домен и углеводный узнающий домен (CRD). В присутствии  $Ca^{2+}$  CRD связывает макромолекулы с терминальной галактозой или N-ацетилгалактозамином. Арабиногалктан, имея на своей поверхности свободные остатки галактозы, связывается с асиалогликопротеиновыми рецепторами. Образующийся комплекс ASGPR-арабиногалктан интернализуется в клетку и вносит аптамеры. Затем рецептор и лиганд диссоциируют, и ASGPR возвращается в клеточную мембрану. ASGPR экспрессируется гепатоцитами, клетками почек, зрелыми дендритными клетками, опухолевыми клетками и др. (Valladeau J. et al., 2001).

## **2. Противоопухолевая терапия с помощью конъюгатов арабиногалктана с ДНК-аптамерами к внутриклеточным мишеням**

Противоопухолевую активность комплекса арабиногалктана с аптамерами (NAS-24-АГ) *in vivo* оценивали с использованием модели аденокарциномы Эрлиха у мышей. Комплекс АГ-NAS-24 (1,6 мг / кг, 1: 1), свободные аптамеры NAS-24, свободный арабиногалктан или фосфатный буфер для контрольных групп вводили ежедневно в хвостовую вену в течение 5 дней. Количество опухолевых клеток, выделенных из брюшной полости, представлено на рисунке 3, уровень некроза и апоптоза на пятый день после начала введения препаратов – на рисунке 4. Видно, что после 5-ти кратного введения конъюгатов АГ-NAS-24 рост асцитной карциномы Эрлиха эффективно подавлялся. Количество опухолевых клеток у мышей, которым вводили конъюгаты арабиногалктана с аптамерами по сравнению с группой мышей, которым вводили только свободные аптамеры NAS-24, свободный арабиногалктан или фосфатный буфер, стало в 5 раз меньше. Конъюгаты арабиногалктана с аптамерами NAS-24 вызывали апоптоз в асцитных клетках карциномы Эрлиха.

Таким образом, исследование показало биологическую и фармакологическую значимость аптамеров, доставляемых в клетку с помощью арабиногалктана.

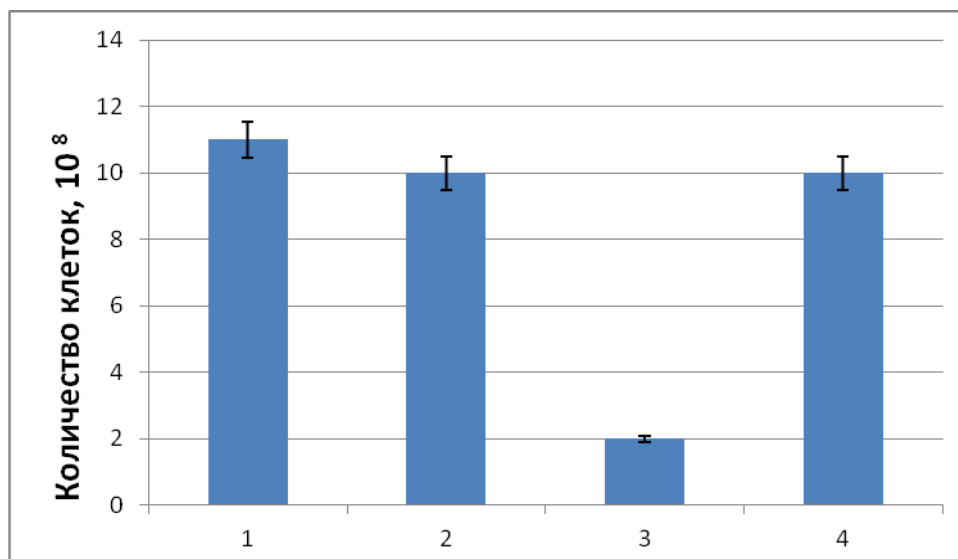


Рисунок 3 – Подавление роста асцитной карциномы Эрлиха конъюгатами ДНК–аптамеров с арабиногалактаном *in vivo*. 1 – PBS; 2 – арабиногалактан; 3 – арабиногалактан + аптамер NAS-24; 4 – аптамер NAS-24.

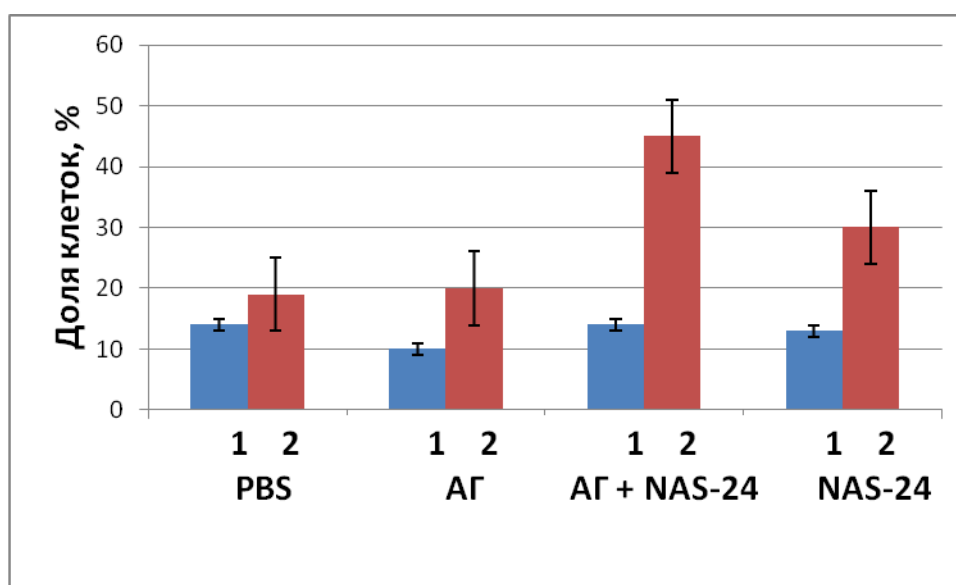


Рисунок 4 – Индукция апоптоза в асцитных клетках карциномы Эрлиха с помощью конъюгатов NAS-24 и арабиногалактана *in vivo*. 1 – некроз, 2 – апоптоз.

### 3. Исследование противоопухолевого эффекта магнитных микродисков, функционализированных ДНК-аптамерами

В работе исследовался биологический эффект никелевых микродисков с дипольной структурой намагниченности, модифицированных биораспознающими молекулами, в условиях воздействия переменного магнитного поля. Для связывания магнитных дисков с асцитными клетками использовались ДНК-аптамеры (AS-9), структура и функция которых

представлена в статье O.S. Kolovskaya et al. (Kolovskaya O.S. et al., 2014).  
 Схема функционализированного ДНК-аптамерами магнитного микродиска  
 представлена на рисунке 5.

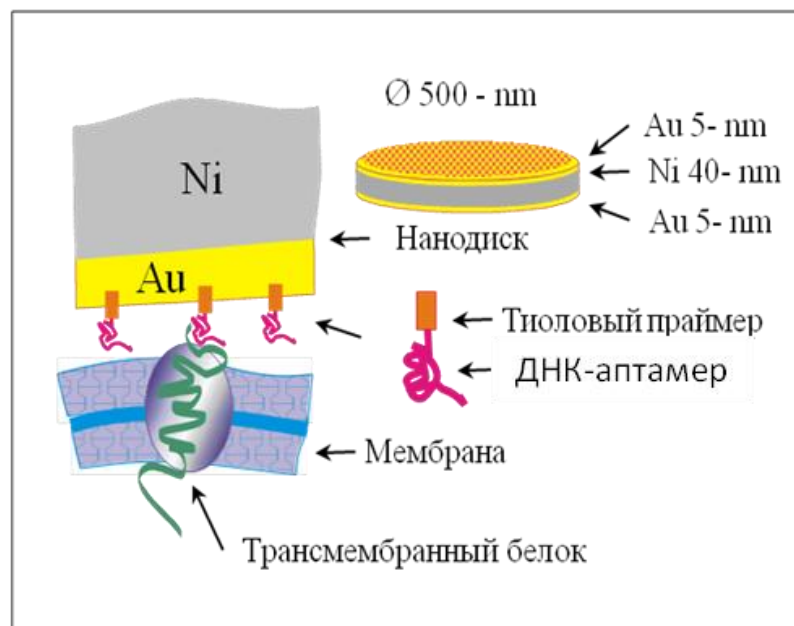


Рисунок 5 – Схема функционализированного ДНК-аптамерами магнитного микродиска

Для исследования биологического эффекта магнитных микродисков в условиях действия магнитного поля на уровне организма в условиях *in vivo* мышам с асцитной карциномой Эрлиха в брюшную полость вводили по 10 млн. микродисков, модифицированных ДНК-аптамерами, в 300 мкл фосфатного буфера. Контрольным мышам вводили по 300 мкл фосфатного буфера. Через 30 минут после введения микродисков мышей помещали в установку, генерирующую переменное магнитное поле 0.01Тл. Время действия магнитного поля составляло 20 мин. Через 60 мин после воздействия магнитного поля у опытных и контрольных животных производили забор асцитных клеток. Клетки отмывали дважды фосфатным буфером и исследовали их функциональное состояние на конфокальном микроскопе Olympus FluoView FV10i. В образцах асцитных клеток, выделенных из мышей-опухоленосителей, наблюдалось разрушение опухолевых клеток, несмотря на то, что соотношение дисков и клеток в карциноме Эрлиха составляло примерно 1:10 (диски/клетки) (Рис. 6), что свидетельствует о высокой эффективности модифицированных ДНК-аптамерами никелевых магнитных нанодисков и переменных магнитных полей для адресной деструкции опухолевых клеток.

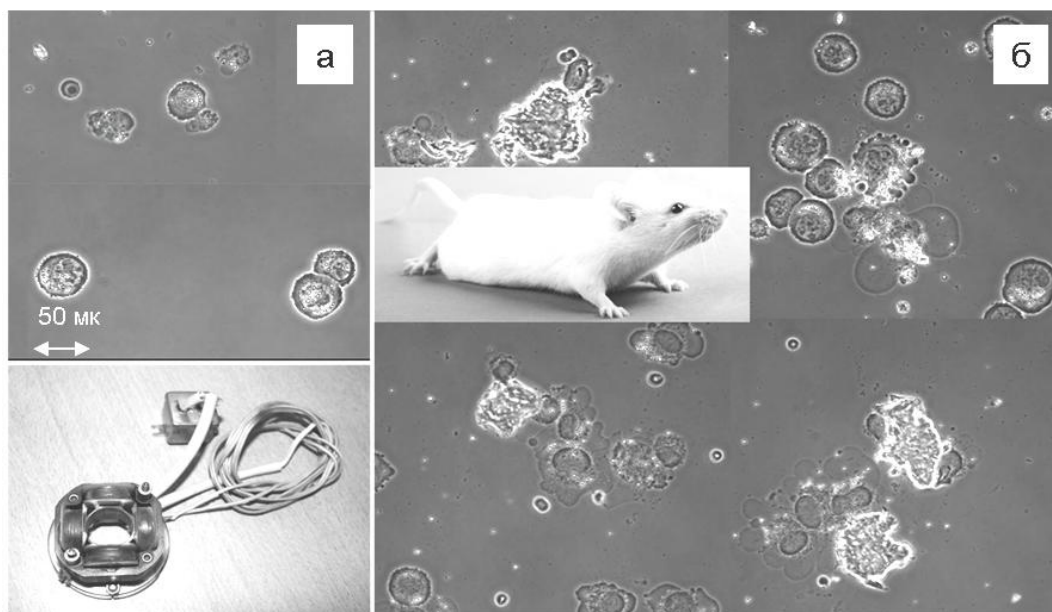


Рисунок 6 – Асцитные клетки карциномы Эрлиха, выделенные из асцитической жидкости: (а) контрольных мышей ((n=5); (б) опытных мышей (n=5) (которым вводили модифицированные ДНК-аптамерами магнитные нанодиски) через 90 мин после воздействия переменного магнитного поля. Наблюдаются случаи некроза и апоптоза.

#### ***4. Исследование противоопухолевого эффекта функционализированных ДНК-аптамерами золотых наночастиц***

Для элиминации опухолевых клеток использовали сферические наночастицы золота, средний размер которых составил 37 нм (Биотест, Новосибирск). В качестве биораспознающих молекул для функционализации наночастиц золота использовали аптамер AS-9, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью к асцитным клеткам карциномы Эрлиха, поэтому конъюгаты наночастиц с этим аптамером хорошо связывались только с асцитными клетками (Kolovskaya O.S. et al., 2014). Асцитные клетки инкубировали с комплексами аптамер-Au-наночастицы и облучали их лазером на длине волны 532 нм. После этого жизнеспособность клеток оценивали методами микроскопии с помощью окрашивания трипановым синим.

Оценка влияния фототермической терапии на функциональное состояние асцитных клеток показала, что в условиях отсутствия наночастиц золота лазерное облучение не индуцирует элиминацию асцитных клеток (Рис.7), поскольку в этих условиях лазер не повышает температуру суспензии до значений, обеспечивающих начало массовой гибели клеток. В условиях воздействия лазера на суспензию асцитных клеток с биоконъюгатами наночастиц золота, функционализированных ДНК-аптамерами к асцитным клеткам, количество поврежденных асцитных клеток в клеточной суспензии увеличилось в несколько раз уже через 4 ч после воздействия лазера (Рис.7).

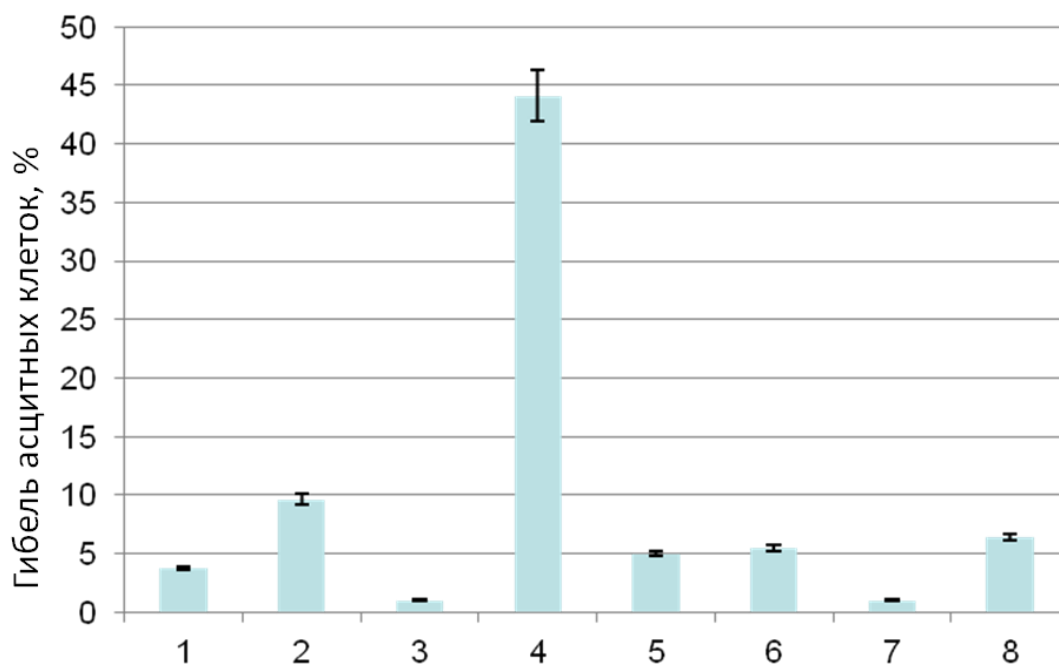


Рисунок 7 – Доля поврежденных асцитных клеток в разных экспериментальных образцах. 1 – асцитные клетки (контроль); 2 – асцитные клетки после 10-ти минутного облучения; 3 – асцитные клетки с функционализированными наночастицами золота, не подвергавшиеся облучению; 4 – асцитные клетки с функционализированными наночастицами золота после 10-ти минутного облучения; 5 – асцитные клетки с аптамерами без облучения; 6 – асцитные клетки с аптамерами после 10-ти минутного облучения; 7 – асцитные клетки с наночастицами, функционализированными аптамерами AG (не связывающиеся с асцитными клетками), без облучения; 8 – асцитные клетки с наночастицами, функционализированными аптамерами AG (не связывающиеся с асцитными клетками) после 10-минутного облучения.

Изменение температуры опухоли при воздействии лазера в условиях *in vivo* контролировали с помощью инфракрасной камеры (Рис.8). Облучение мышей лазером проводили в течение 4-х сеансов. Исследование показало, что у мышей, которым перед облучением лазера вводили функционализированные аптамерами к асцитным клеткам золотые наночастицы опухоль после первых сеансов некротизировалась, а затем исчезала. Во всех других группах животных опухоль увеличивалась в размерах.

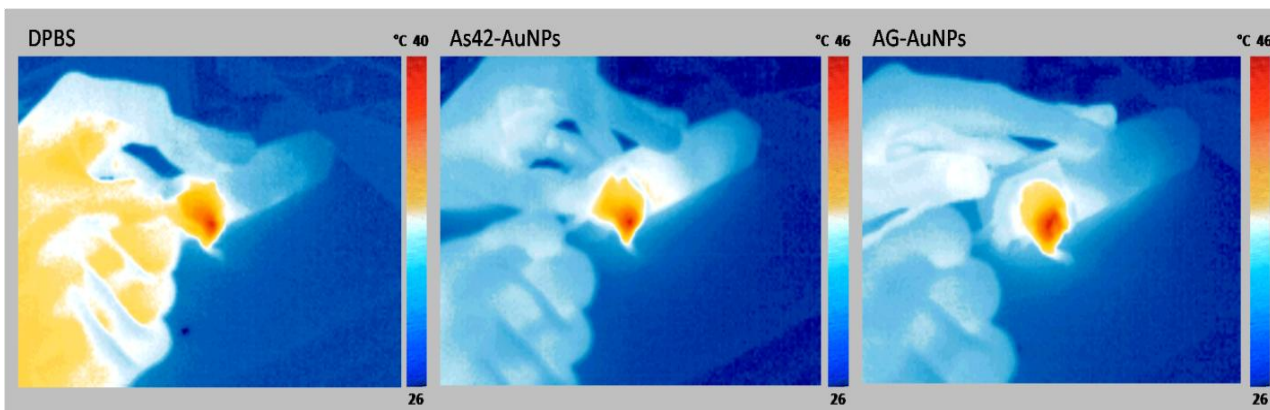


Рисунок 8 – Термические изображения опухолевых очагов после внутривенной инъекции фосфатного буфера, конъюгатов аптамеров с золотыми наночастицами AS42-AuNPs и конъюгатов неспецифических олигонуклеотидов с золотыми наночастицами AG-AuNPs через 5 мин после начала лазерного облучения, 1,2 Вт.

Визуализация опухоли при изучении влияния лазерной гипертермии в условиях *in vivo*, осуществленная с помощью метода позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием радиоактивной глюкозы, подтвердила полученные данные (Рис.9). Мониторинг терапии опухоли проводили с помощью радиоактивной глюкозы с использованием ПЭТ-КТ на 7, 9 и 11 день лечения. Результаты исследования показали отсутствие опухоли на 14-ый день после начала лечения. До лечения по внутренней поверхности правого бедра определяется образование мягкотканной плотности (42-45 ед. HU) однородной структуры, округлой формы до 15 мм в диаметре, активно накапливающее  $[^{18}\text{F}]$  – фтордезоксиглюкозу. Помимо этого глюкоза также накапливалась в мочевом пузыре и печени мышей. На 14-й день развития опухоли (после 3-х процедур лечения) у контрольной мыши, которой вводили фосфатный буфер, опухоль выросла в размерах и составила 20 мм в диаметре, глюкоза стала активно накапливаться (Рис. 9-1).

После того, как произвели 3-ю инъекцию фосфатного буфера с последующим лазерным облучением, опухоль выросла в размерах больше, чем без воздействия лазера, но в этой опухоли глюкоза активно накапливалась только в центральной области, в ранее визуализируемой метаболически активной опухоли отмечалась зона пониженной плотности (23-26 HU) с нечеткими контурами диаметром до 13 мм без признаков метаболической активности  $[^{18}\text{F}]$ -фтордезоксиглюкозы – зона некроза. Глюкоза также накапливалась в мочевом пузыре мышей (Рис. 9-3).



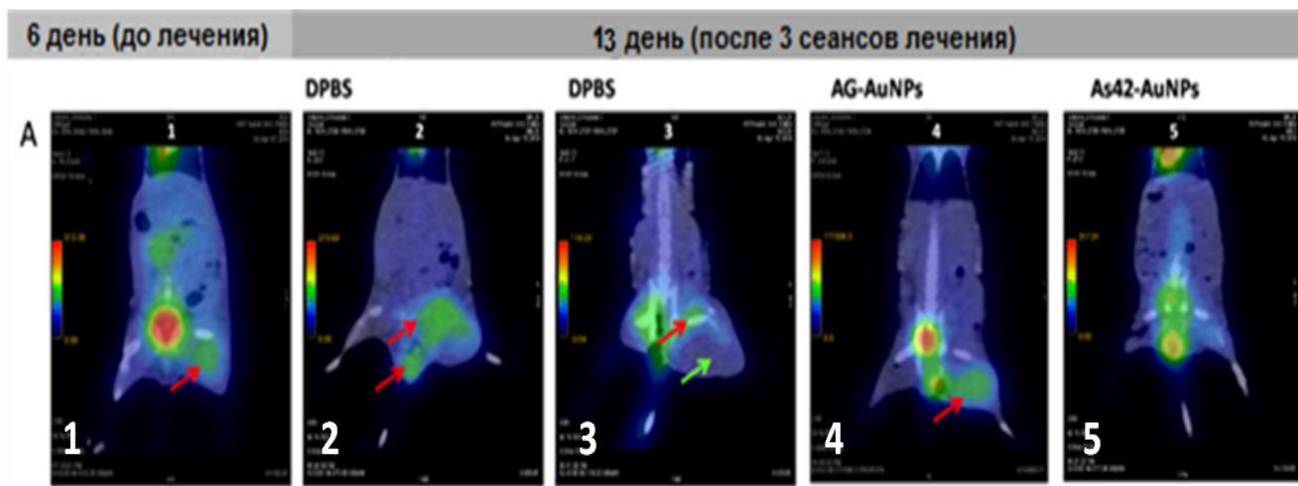


Рисунок 9 – Мониторинг терапии опухоли с помощью радиоактивной глюкозы с использованием ПЭТ-КТ. ПЭТ-КТ мыши с использованием радиоактивной глюкозы на 7, 9 и 11 день лечения. На 13-ый день лечения видно отсутствие опухоли. Позитронно эмиссионная томография в сочетании с компьютерной томографией для мониторинга роста опухоли.

1 – мышь до начала лечения на 6-й день после трансплантации опухоли;  
 2-5 – 14-й день развития опухоли после 3-х сеансов лечения на 7, 9, 11 дни.  
 2 – особь из первой экспериментальной группы, которой вводили по 100 мкл чистого фосфатного буфера; 3 – мыши, которым вводили 100 мкл чистого фосфатного буфера, с последующим 5 минутным облучением 532 нм лазером; 4 – лечение с помощью неспецифического олигонуклеотида на золотых наночастицах, с последующим 5 минутным облучением лазером; 5 – лечение с помощью аптамер-модифицированных золотых наночастиц, с последующим 5 минутным облучением 532 нм лазером. Лазерное облучение - 1,2 Вт.

Данные ПЭТ / КТ соответствует гистологическим анализам, показывающим, что основная масса опухоли у мышей подверглась некрозу (60-70%). В некоторых областях это сопровождалось заметной пролиферацией фиброзных тканей. Воспаление находилось на поверхности, и под некротическими областями наблюдалась интенсивная агрегация лейкоцитов, кровоизлияние и отек. Глубоко в ткани были видны некротические участки, но в то же время присутствовали неразрушившиеся раковые клетки.

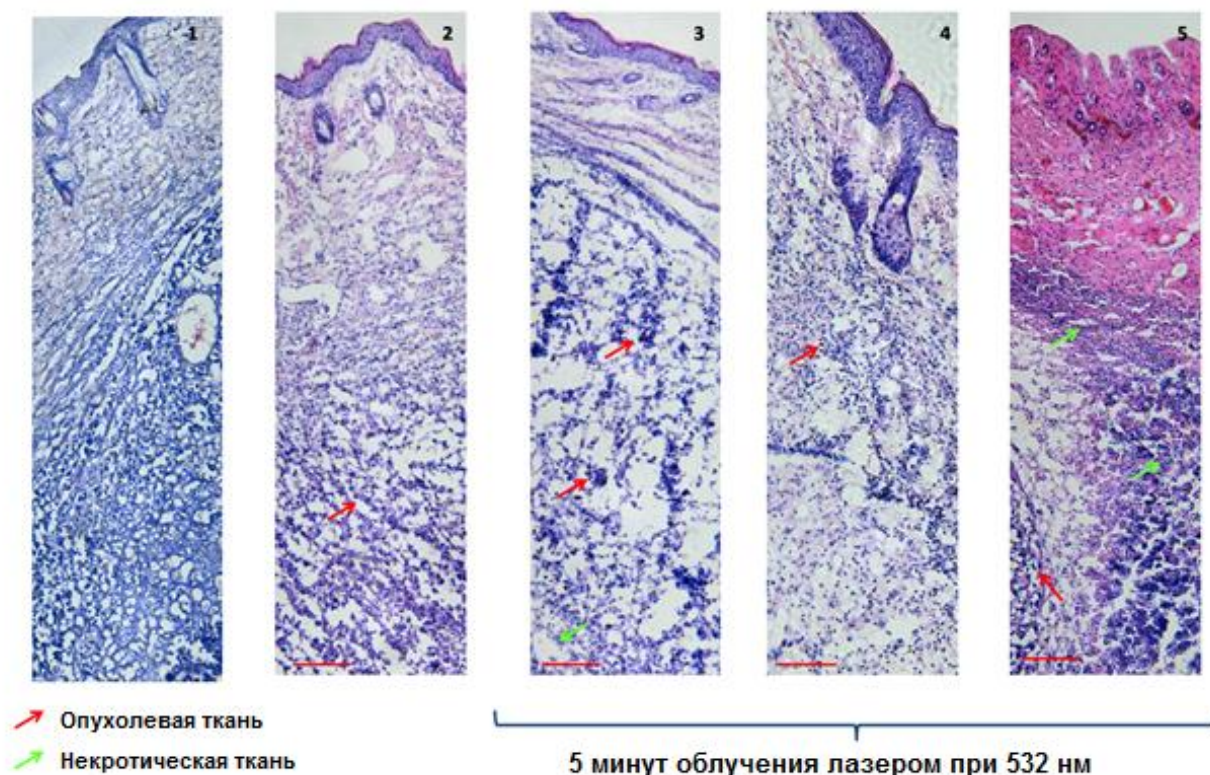


Рисунок 31 – Гистологические срезы опухоли у мышей разных групп. 1 – мышь до начала лечения на 6-й день после трансплантации опухоли; 2-5 – 14-й день развития опухоли после 3-х сеансов лечения на 7, 9, 11 дни. 2 – особь из первой экспериментальной группы, которой вводили по 100 мкл чистого фосфатного буфера; 3 – мыши, которым вводили 100 мкл чистого фосфатного буфера, с последующим 5 минутным облучением 532 нм лазером; 4 – лечение с помощью неспецифического олигонуклеотида на золотых наночастицах, с последующим 5 минутным облучением лазером; 5 – лечение с помощью аптамер-модифицированных золотых наночастиц, с последующим 5 минутным облучением 532 нм лазером. Лазерное облучение - 1,2 Вт.

### ***5. Исследование токсичности магнитных микродисков и золотых наночастиц***

Необходимым условием применения наночастиц для терапии онкологических заболеваний является их нетоксичность, особенно это значимо при длительном приеме. Для материалов, которые будут служить основой наночастиц в обязательном порядке должна быть определена гепатотоксичность, поскольку, несмотря на то, что наночастицы золота являются биосовместимыми и условно нетоксичными, существует проблема их выведения, так как они способны накапливаться в организме.

В научной литературе однозначного ответа на вопрос о токсичности магнитных и золотых наночастиц не существует. Биораспределение и различные благоприятные и негативные эффекты, оказываемые на организм для разных типов конъюгатов, отличаются. Известно, что на токсичность



вливают материал, размер, форма, поверхностный заряд, функционализация поверхности и др. (Umair M. et al, 2016).

Для оценки токсичности магнитных микродисков и золотых наночастиц нами было использовано 3 группы мышей (по 9-10 животных в каждой группе). В первую группу входили особи, которым вводили конъюгаты наночастиц золота с аптамерами, вторая группа получала инъекции связанных с аптамерами магнитных микродисков. 3-я группа выступала в качестве контрольной, животным из этой группы вводили физиологический раствор.

Оценку токсичности проводили по содержанию холестерина, общего белка и билирубина и активности аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы. Эти показатели были выбраны потому, что они характеризуют функцию печени, играющую основную роль в обезвреживании ксенобиотиков.

Проведенные исследования показали, что уровень холестерина, билирубина, общего белка в группах особей, получавших инъекции функционализированных ДНК-аптамерами магнитных никелевых микродисков, покрытых золотом, и золотых наночастиц, практически не изменился. Активность аланинаминотрансферазы в плазме крови мышей, которым вводили магнитные микродиски повысилась на 30%, а у животных, которым вводили золотые наночастицы практически не изменилась. Влияние золотых наночастиц и магнитных микродисков на активность щелочной фосфатазы было обратным. Функционализированные ДНК-аптамерами магнитные никелевые микродиски, покрытые золотом, не изменяли активность аланинаминотрансферазы, тогда как золотые наночастицы увеличивали активность этого фермента на 30%.

Таким образом, исследование влияния функционализированных ДНК-аптамерами магнитных микродисков и золотых наночастиц не выявило значительных изменений в биохимических параметрах крови животных, которым в течение недели вводили эти конъюгаты.

В целом, результаты работы показали перспективность использования конъюгатов аптамеров с арабиногалактаном, магнитными микродисками и золотыми наночастицами для адресной деструкции опухолевых клеток.

## **ВЫВОДЫ**

1. Арабиногалактан способствует переносу нуклеиновых кислот в клетку. В присутствии арабиногалактана значительно возрастает транспорт аптамеров и плазмиды зеленого флуоресцентного белка в нормальные (фибробласты, клетки кумулуса) и опухолевые (асцитные) клетки, на мембране которых присутствуют асиалогликопротеиновые рецепторы. Перенос нуклеиновых кислот в клетку происходит путем эндоцитоза, вызванного связыванием асиалогликопротеиновых рецепторов с галактозой арабиногалактана.
2. Конъюгаты арабиногалактана с аптамерами NAS-24 к внутриклеточному белку виментину подавляют рост асцитной карциномы Эрлиха в

- условиях *in vivo*. Механизм противоопухолевого эффекта конъюгатов связан с индукцией апоптоза асцитных клеток.
3. Функционализированные ДНК-аптамерами магнитные никелевые микродиски, покрытые золотой оболочкой, под влиянием переменного магнитного поля способствуют гибели опухолевых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo* путем некроза.
  4. Функционализированные ДНК-аптамерами золотые наночастицы в условиях индуцированного лазером плазмонного резонанса, приводящего к гипертермии, стимулируют разрушение опухолевой ткани.
  5. Функционализированные ДНК-аптамерами магнитные никелевые микродиски, покрытые золотой оболочкой, и золотые наночастицы не обладают токсическим эффектом.

**Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:**

1. Zamay T.N., Kolovskaya O.S., Глазырин Ю.Е., Zamay G.S., Kuznetsova S.A., Spivak E.A., Wehbe M.A., Savitskaya A.G., Zubkova O.A., Kadkina A.V., Wang X.C., Muharemagic D.A., **Dubynina A.V.**, Sheina Y.A., Salmina A.B., Berezovski M.V., Zamay A.S. DNA-aptamer targeting vimentin for tumor therapy in vivo // *Nucleic Acid Therapeutics*. 24 (2), 160-170.
2. **Dubynina A.V.**, Semina P.N., Sokolov A.E., Zabluda V.N., Alexandrovskii A.S., Karacharov A.S., Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Ivanchenko T.I., Govorina Y.B., Zamay A.S., Zamay T.N. Aptamer-mediated Targeted Hypertermia Caused by Gold Nanoparticles // *The Oligo Meeting. 11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society*. -Leiden, Oligotherapeutics. -2015. -P.127.
3. Zamay G.S., Zamay T.N., Kolovskaya O.S., Shabanov A.V., **Dubinina A.V.**, Krat A.V., Modestov A.A., Sokolov A.E., Chesnokov N.V., Gargaun A.A., Berezovski M.V., Zamay A.S. Aptasensor for cancer-related protein detection in crude blood plasma samples // *The Oligo Meeting. 11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society*. -Leiden, Oligotherapeutics. -2015. -P.138.
4. **Дубынина А.В.**, Семина П.Н., Соколов А.Э., Замай Т.Н. Использование метода кругового дихроизма и биофункциональных наноконплексов на основе ДНК-аптамеров для диагностики злокачественных новообразований // *Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции*. - Волгоград, ИЦРОН. -2015. -С.140-141.
5. Zamay T.N., Belyanina I.V., Alexandrovskii A.A., Sokolov A.E., **Dubinina A.V.**, Zamay G.S., Garanzha I.V., Glazyrin Y.E., Kolovskaya O.S., Ivanchenko T.I., Chanchikova N.G., Tokarev N.A., Shepelivich N.V., Karlova E.A., Ozerskaya A.V., Badrin E.A., Beluginc K.V., Belkin S.A., Zabluda V.N., Berezovski M.V., Zamay A.S. Selective elimination of tumor cells in vivo using laser plasmon resonance of aptamer functionalized gold

- nanoparticles // Aptamers in Bordeaux.- Bordeaux, Bordeaux\_Ap. -2016.- P.79.
6. Zamay G.S., Zamay T.N., Kolovskaya O.S., Krat A.V., Glazyrin Yu.E., **Dubinina A.V.**, Zamay A.S. Development of a biosensor for electrochemical detection of tumor-associated proteins in blood plasma of cancer patients by aptamers // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. -2016. -466 (1). -P.70-73.
  7. Kim P.D., Zamay S.S., Zamay T.N., Procopenko V.S., Kolovskaya O.S., Zamay G.S., Princ V.Y., Seleznev V.A., Komov A.I., Spivak E.A., Rudenko R.Y., **Dybinina A.V.**, Komarov A.V., Denisenko V.V., Komarova M.A., Sokolov A.E., Narodov A.A., Zjivaev V.P., Zamay A.S. The antitumor effect of magnetic nanodiscs and DNA aptamer conjugates // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. -466(5). -P.616-619.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий Государственного бюджетного образовательного учреждения «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения России.

Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам Лаборатории, без постоянной помощи и поддержки которых, плодотворного обсуждения идей, планов экспериментов и полученных результатов эта работа не могла бы состояться.

Выражаю свою искреннюю благодарность Анне Кичкайло, Галине Замай, Ольге Коловской, Ирине Беляниной, Валентине Григорьевой, Ирине Гаранже, Юрию Глазырину, Дмитрию Вепренцеву, Татьяне Иванченко, Полине Семиной за помощь в проведении экспериментов, анализе данных, плодотворные обсуждения результатов, вдохновение и повсеместную поддержку.

Выражаю благодарность сотрудникам Центра ядерной медицины СКЦ ФМБА России за проведение исследований по мониторингу роста опухоли с помощью позитронно-эмиссионной томографии и компьютерной томографии.

Особой благодарностью хотелось бы отметить Максима Валентиновича Березовского и Алексея Эдуардовича Соколова.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение №14.607.21.0104) с использованием оборудования ЦКП Красноярского научного центра Сибирского отделения Российской Академии наук.