

**Конкуренция
Практика
Достижения**

Найдут и обезвредят

Одолеть онкологические заболевания помогут аптамеры

Началось все с того, что Татьяна Замай, профессор Сибирского федерального университета (СФУ), поехала на стажировку в Канаду, где познакомилась с профессором Максимом Березовским, кстати, выпускником Новосибирского государственного университета, ныне работающим в Университете Оттавы. Одна из тем возглавляемой им исследовательской группы - развитие биосенсоров на основе аптамеров - очень ее заинтересовала. В России в то время никто ничем подобным не занимался. Почему бы не начать развивать это направление в Красноярске?

Сложилось сотрудничество. Татьяна Замай, вернувшись в родной сибирский город, увлеченно приступила к освоению новой научной области. Показалась привлекательной тема аптамеров и ее дочери, Анне Замай, выпускнице физфака Красноярского государственного университета по специальности "Биофизика". Шел 2009 год. На средства индивидуального молодежного гранта Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности были куплены первые реактивы и все необходимое для начала исследований. И работа пошла.

Сегодня Анна Замай - доктор биологических наук, руководитель Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий Красноярского государственного медицинского университета (КрасГМУ) им. В.Ф.Войно-Ясенецкого. Кроме того, она ведущий технолог лаборатории 2.1 Института химии и химической технологии Сибирского отделения РАН (ИХХТ СО РАН) и руководитель проекта, поддержанного Минобрнауки РФ в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы". Тема этого проекта звучит так: "Разработка мультиплексных электрохимических сенсорных систем на основе наночастиц благородных металлов и ДНК-аптамеров для диагностики рака легкого", шифр по лоту 2014-14-576-0114.

Аптамеры - синтетические одноцепочечные молекулы РНК или ДНК, способные связываться с желаемыми мишенями. Иначе говоря, одноцепочечная молекула ДНК образует трехмерную структуру, напоминающую кольцо с отходящими от него "хвостами" разной длины. Вот ими-то она и "связывается" с участками молекулы того или иного белка. От последовательности образующих молекулу ДНК олигонуклеотидов зависит конформация (геометрические формы, которые могут принимать молекулы) аптамера, а значит, и его сродство к мишени (то есть сила связывания с молекулой выбранного исследователем белка). Подобрать нужную последовательность из большой библиотеки аптамеров, ученые получают те, что им нужны, например те, что связываются с клетка-

ми злокачественных опухолей. Селекция - дело, прямо скажем, не из легких: ведь такая библиотека включает в себя 10 в 12-й степени различных последовательностей (видов аптамеров), а для решения поставленной задачи подходят лишь единицы. Аптамеры называют "цифровыми лекарствами": на их основе можно изготавливать

ров. Те аптамеры, что связались со здоровыми клетками, нам не нужны, и мы их отделяем. Оставшиеся аптамеры инкубируем с клетками рака. Убираем несвязавшиеся аптамеры, а те, что связались, оставляем. Увеличиваем количество их амплифицированных копий. При амплификации олигонуклеотидов появляются

или иного ракового заболевания. Однако наличие опухоли невозможно определить только по одному-единственному белку. Да и концентрация очень многих известных биомаркеров в крови разных пациентов даже с одним и тем же диагнозом сильно варьирует. У одного страдающего раковым заболеванием эта

концентрация очень высокая, у другого - низкая, но это не значит, что у него нет рака! И болезнь можно упустить. Поэтому сейчас ученые пришли к тому, что для более точной диагностики необходимы комплекс различных биомаркеров - сигнатура. Однако не все онкомаркеры, что применяются сейчас, обладают достаточной специфичностью, то есть у них отсутствует строгая избирательность по отношению к мишеням, с которыми они связываются. Мультиплексная система с использованием шести аптамеров, полученных к опухолевой ткани, позволит диагностировать рак более точно.

Сейчас, на втором этапе выполнения проекта, биологи проводят



Анна Замай проводит измерения на проточном цитометре

диагностические и терапевтические препараты. За рубежом исследования в этой области начались в конце 1990-х годов, и они считаются очень перспективными.

- Все знают про белковые антитела, их используют при диагностике в лабораториях, - объясняет Анна Замай. - ДНК-аптамеры - аналоги белковых антител. По функциональным характеристикам они абсолютно одинаковы. Даже по особенностям работы очень похожи. Однако аптамеры имеют несколько преимуществ: белок требовательный к условиям хранения, дорогой в производстве. А аптамеры с известной последовательностью нуклеотидов можно легко и довольно дешево синтезировать в любых количествах. Можно модифицировать их флуоресцентными или другими метками - тогда, связавшись с клеткой опухоли, аптамер выдаст ее присутствие свечением. Можно присоединять к нему лекарства и обеспечивать адресность их доставки. Например, препараты для лечения заболеваний мозга имеют очень нежелательные побочные эффекты, а использование аптамеров позволяет доставить лекарство точно к пораженным тканям и снизить негативное воздействие на здоровые клетки за счет уменьшения концентрации препарата.

- Каким образом вы отбираете нужную последовательность?

- Если мы подбираем аптамеры к опухолевой ткани, сначала берем клетки крови здорового человека и здоровую ткань. Мы не хотим, чтобы аптамеры с ними связывались. Инкубируем с этими клетками библиотеку аптаме-

случайные изменения в последовательности, необходимые для осуществления направленной "эволюции в пробирке".

Делаем несколько таких раундов, идем раз 10-15 по этому кругу. И дальше проверяем, в каком раунде у нас получились аптамеры, которые лучше всего связываются с желаемыми мишенями - раковыми клетками - и не связываются с остальными клетками. Можно аналогично проверить полученные аптамеры к клеткам других видов опухоли. Чем строже негативная селекция, тем лучше получаются аптамеры.

Дальше проводим секвенирование, узнаем последовательности нуклеотидов во всех аптамерах, присутствующих в этом пуле. Раньше использовали более простой метод клонирования, картина была не совсем полной. Сейчас мы делаем полноценное секвенирование и получаем абсолютно все последовательности. Выбираем методами биоинформатики целые семейства аптамеров, а из них те, которые встречаются чаще: значит, они лучше связываются с клетками мишени.

В ходе проектов, поддержанных грантами ФЦП "Исследования и разработки" в прошлые годы, в лаборатории были получены аптамеры к ткани рака легкого человека, которые позволяют идентифицировать клетки и продукты распада опухоли в клинических образцах. Если аптамерами окрасить опухолевую ткань, под микроскопом хорошо различимы скопления раковых клеток и здоровые участки.

О возникновении онкозаболевания можно судить по появлению в крови онкомаркеров - белков, характерных для того

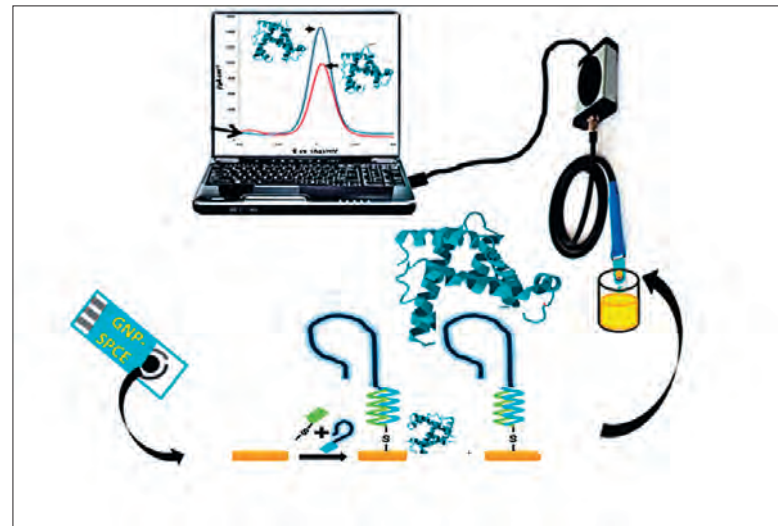
заболевания. Но испанская электрохимическая станция, отмечает А.Замай, базируется только на одном биосенсоре. Кроме того, погрешность, с которой она выдает результат, достаточно большая для точных исследований, которые ведутся в лаборатории. Взав за основу принцип действия этого прибора, красноярцы хотят сделать его усовершенствованным аналогом - для мультиплексной детекции сигнатуры из шести стандартных белков-онкомаркеров и шести новых кандидатов в биомаркеры рака легкого. Вот такое импортозамещение.

- Рак - индивидуальное заболевание; одинаковая по названию опухоль на самом деле у каждого своя, - поясняет Анна Замай. - У кого-то из больных одних белков-биомаркеров больше, у кого-то - других. Поэтому для того, чтобы поставить точный диагноз, необходимо комплексное исследование. И, соответственно, мультиплексный биосенсор.

Поскольку работа проводится в тесном сотрудничестве с врачами-онкологами Красноярского краевого онкологического диспансера им. А.И.Крыжановского, ученые точно знают, какой результат нужен для использования в клинической практике.

К третьему этапу проекта, на котором предстоит секвенирование и синтез аптамеров, мультиплексный сенсор, как ожидается, уже будет готов, и можно будет проводить его испытания.

Для решения сложной задачи диагностики рака легкого в Красноярске объединились не только ученые и специалисты из многих отраслей науки и направлений практической деятельности - биологи, медики, химики, хирурги, инженеры, есть даже математик, но и разные организации. В начале апреля этого года было подписано соглашение о совместной деятельности по разработке и обеспечению производства биосенсорных тест-систем для



Принцип работы электрохимического биосенсора для диагностики онкозаболеваний на основе ДНК-аптамеров

селекцию аптамеров к шести стандартным белкам-онкомаркерам, выбирают лучший пул. Параллельно ведут свои исследования химики. И уже есть результаты. Идею подсказала портативная электрохимическая станция - прибор размером чуть больше сигаретной коробки, привезенный из Испании. Принцип его действия следующий: при связывании белков-онкомаркеров плазмы крови пациента с аптамерами, "сидящими" на золотом электроде, изменяется сопротивление биосенсорной поверхности. Информация выводится на монитор компьютера, и по ней можно судить о наличии

диагностики онкологических заболеваний на основе ДНК-аптамеров между КрасГМУ им. В.Ф.Войно-Ясенецкого, Краевым онкологическим диспансером им. А.И.Крыжановского (далее - онкодиспансер), Красноярским научным центром СО РАН, Институтом химии и химических технологий СО РАН, Институтом физики СО РАН и КБ "Искра".

- В чем особенность наших исследований? Мы выбираем аптамеры именно к тканям, - говорит А.Замай. - Из онкодиспансера в лабораторию поступают образцы опухолевых тканей после операций, и мы ищем аптамеры непосредственно к ним. Этиче-