

УДК 577.29

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ДНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 2012 Т.Н. Замай¹, Г.С. Замай¹, А.С. Замай¹, О.С. Коловская¹, Е.А. Малышева¹,
А.Г. Савицкая¹, А.В. Крат², В.К. Бельтюков², А.А. Модестов², Д.В. Попов²,
Л.Л. Петрова¹, Л.В. Труфанова¹, О.А. Зубкова¹, Е.А. Спивак¹

¹ Красноярский государственный университет имени профессора
В.Ф. Войно-Ясенецкого

² Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени
А.И. Крыжановского

Поступила в редакцию 03.10.2012

Работа посвящена описанию метода диагностики рака легкого человека с помощью одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, специфичных к опухолевой ткани легкого человека, полученных методом технологии cell-SELEX. Исследования показали, что короткие однонитевые ДНК способны выявлять в плазме крови онкобольных продукты распада опухолевой ткани и могут быть использованы для диагностики рака легкого человека.

Ключевые слова: диагностика, рак легкого, ДНК-олигонуклеотиды

Среди всех видов онкозаболеваний рак легкого является наиболее распространенной формой злокачественных новообразований. Он затрагивает более миллиона людей по всему миру [1] и составляет около 25% всех смертей от

рака [4]. Относительная пятилетняя выживаемость пациентов при раке легкого очень низка, она составляет 13-15% для развитых стран [6] и 9% для развивающихся [3]. Однако, несмотря на разнообразие существующих методов диагностики, выявляемость больных с I-II стадиями рака легкого составляет около 27%, а больных с III-IV стадиями – 66% [2]. При этом 5-летняя выживаемость после лечения I стадии РЛ соответствует 70%, а IV стадии – только 5% [2]. Таким образом, снижение смертности от рака легкого человека невозможно без ранней диагностики этого заболевания.

За последние годы произошел значительный прогресс в области фармакологии. В медицинскую практику стали внедряться новые диагностические и лекарственные средства, полученные с помощью современных биотехнологий, перечень которых достаточно широк и включает белки (гормоны, цитокины, факторы свертывания крови, моноклональные антитела, ферменты, колониестимулирующие факторы, вакцины и препараты, созданные на базе клеток и тканей), полученные с помощью генно-инженерных и гибридных технологий. В то же время все чаще начали применяться диагностические и лекарственные препараты на основе аптамеров – искусственных антител, которые по своей природе являются олигонуклеотидами. Чувствительность диагностических систем на основе аптамеров очень высока и зависит от типа мишени. В частности, аптамеры к небольшим молекулам имеют чувствительность на микромолярном уровне, а к белкам проявляют чувствительность на наномолярном и даже на субнаномолярном уровнях.

Замай Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биологической химии. E-mail: tzamay@yandex.ru

Замай Галина Сергеевна, аспирантка

Замай Анна Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии. E-mail: annazamay@yandex.ru

Коловская Ольга Сергеевна, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии. E-mail: zatauykin@gmail.com

Малышева Елена Александровна, аспирантка

Савицкая Анна Геннадьевна, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии. E-mail: sannna3061@gmail.com

Крат Алексей Васильевич, врач-онколог

Бельтюков Виктор Константинович, врач-онколог

Модестов Андрей Арсеньевич, кандидат медицинских наук, главный врач. E-mail: onkolog24@ikrasmail.ru

Попов Дмитрий Владимирович, заместитель главного врача

Петрова Людмила Львовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии. E-mail: mi-la0@yandex.ru

Труфанова Людмила Васильевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии

Зубкова Ольга Александровна, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии. E-mail: 25.12.90.olya@rambler.ru

Спивак Екатерина Александровна, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии. E-mail: e.spivak@mail.ru

Цель работы: описание нового метода диагностики рака легкого человека на основе одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов (аптамеров).

Материалы и методы исследований. Для селекции искусственных антител к опухолевой ткани легкого человека использовали послеоперационный материал опухолевой ткани легкого человека, предоставленный Красноярским краевым клиническим онкодиспансером. Для селекции использовали послеоперационный материал трех гистологических типов рака легкого (плоскоклеточный ороговевающий, плоскоклеточный железистый и мелкоклеточный), взятый от пациентов в возрасте 50-70 лет. Гистологический тип рака легкого при отборе искусственных антител не учитывался. Работа с биологическим материалом осуществлялась с разрешения Локального этического комитета Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» и Красноярского краевого клинического онкологического диспансера. Получение аптамеров к опухолевой ткани легкого человека проводили методом чередования позитивной и негативной селекции одноцепочечных ДНК-аптамеров из ДНК-библиотек N80 методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) [5]. Полученный пул аптамеров клонировали. Отдельные клоны, обладающие наибольшей специфичностью к опухолевой ткани, секвенировали. В результате были получены искусственные антитела (аптамеры) к опухолевой ткани легкого человека с флуоресцентной меткой Alexa-488, которые использовали для определения продуктов распада опухолевой ткани легкого человека в плазме крови. Для этого плазму крови инкубировали в течение 30 мин с маскирующей ДНК (0,1 мг/мл) для закрытия неспецифических сайтов связывания, а затем в течение следующих 30 мин – с аптамерами, связанными с биотином, и магнитными частицами, связанными со стрептавидином. Полученные комплексы концентрировали с помощью магнита на стенке пробирки, а надосадочную жидкость удаляли, затем комплексы, содержащие онкомаркеры, аптамеры и магнитные частицы, дважды отмывали фосфатным буфером с Ca^{2+} и Mg^{2+} (pH 7,4) и разводили в 15 мкл буфера. После этого к исследуемому образцу добавляли аптамеры, меченые флуоресцентной меткой, и трижды отмывали фосфатным буфером с Ca^{2+} и Mg^{2+} (pH 7,4). Подготовленный образец исследовали с помощью люминесцентной микроскопии на наличие флуоресцентной метки, свидетельствующей о присутствии в сыворотке крови белков опухолевой ткани.

Результаты и обсуждение. Селекцию аптамеров к опухолевой ткани легкого человека осуществляли путем чередования позитивной и

негативной технологии cell-SELEX, поскольку она позволяет выбрать наиболее специфичные для опухолевой ткани аптамеры и исключить олигонуклеотиды, способные связаться со здоровой тканью легкого. Оценку специфичности аптамеров к ткани рака легкого осуществляли с помощью люминесцентной микроскопии. После инкубации аптамеров с опухолевой тканью легкого человека появлялась флуоресценция, свидетельствующая о ее связывании с аптамерами, в то время как эти аптамеры не связывались со здоровой тканью, вследствие чего флуоресценции не наблюдалось (рис. 1).

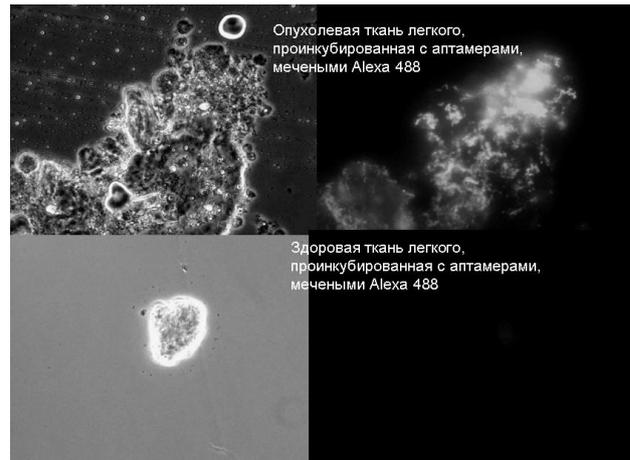
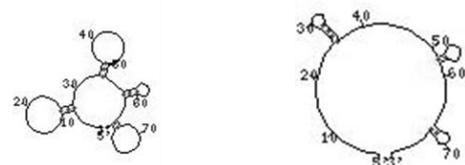


Рис. 1. Микроскопия опухолевой и здоровой тканей легкого человека: слева – световая микроскопия, справа – люминесцентная микроскопия

Для разделения полученного пула аптамеров на отдельные виды осуществляли процесс клонирования, в результате которого получали клоны аптамеров, подходящие для секвенирования. В результате было получено 25 уникальных последовательностей олигонуклеотидов, обладающих высокой степенью аффинности к опухолевой ткани. На основе полученных нуклеотидных последовательностей аптамеры были искусственно синтезированы. Примеры вторичных структур двух аптамеров представлены на рис. 2.



Ctcctctgactgtaaccacgactc atgagggtgtctcactttc attaacgacgttttaacgcgc ataggtatgcccagaagcc
 Ctcctctgactgtaaccacgctttgtcttagccgaattt actaacgcggggtgatcagc ataggtatgcccagaagcc

Рис. 2. Примеры вторичной конформации 17 и 19 клонов аптамеров к опухолевой ткани легкого человека

Наиболее специфичные клоны аптамеров были использованы для выявления в плазме онкобольных продуктов распада опухолевой ткани. Белки, выделенные из сыворотки крови онкобольных с помощью аптамеров и магнитных частиц, флуоресцировали в зеленом диапазоне. Аналогично проведенные процедуры с кровью здоровых людей не выявляли флуоресцирующих белков в сыворотке (рис. 3).

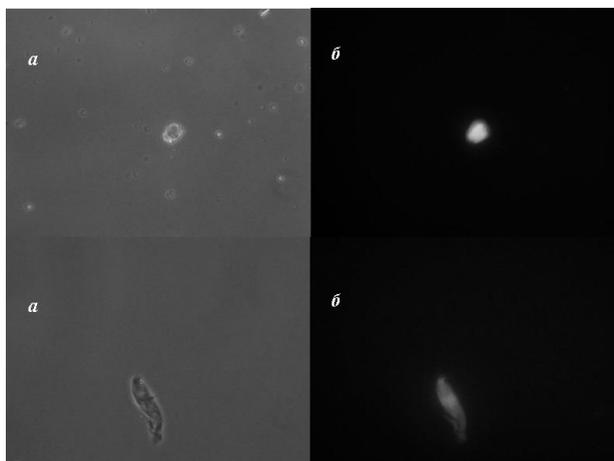


Рис. 3. Микроскопия плазмы крови больных раком легкого: *а* – световая микроскопия, *б* – флуоресцентная микроскопия

Выводы: проведенные исследования подтвердили возможность использования аптамеров к раку легкого человека для выявления продуктов распада опухоли в плазме крови онкобольных,

а, следовательно, и возможность их применения для диагностики рака легкого человека.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (Государственный контракт № 16.512.11.2090) и КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Артамонова, Е.В. Основные достижения в биологии, скрининге, диагностике и лечении немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) // Практическая онкология. 2011. №1. С. 26-35.
2. Левченко, Е.В. Скрининг рака легкого // Практическая онкология. 2010. №2. С. 88-95.
3. Шевченко, В.Е. Профилирование низкомолекулярного протеома плазмы крови для обнаружения потенциальных маркеров рака легкого / В.Е. Шевченко, Н.Е. Арноцкая, О.П. Трифонова и др. // Масс-спектрометрия. 2007. №4. С. 245-253.
4. Arya, S.K. Lung Cancer and Its Early Detection Using Biomarker-Based Biosensors / S.K. Arya, S. Bhansali // Chem. Rev. 2011. 111. P. 6783-6809.
5. Berezovsky, M. Aptamer-Facilitated Biomarker Discovery (AptaBID) / M. Berezovsky, M. Lechmann, M. Musheev et al. // J. Am. Chem. Soc. 2008. 130. P. 9137-9143.
6. Fiorentino, F.P. CTCF and BORIS Regulate Rb2/p130 Gene Transcription: A Novel Mechanism and a New Paradigm for Understanding the Biology of Lung Cancer / F.P. Fiorentino, M. Macaluso, F. Miranda // Molecular cancer research. 2011. №9. P. 225-233.

METHOD OF LUNG CANCER DIAGNOSTICS WITH THE HELP OF ONE-CHAINED DNA-OLIGONUCLEOTIDES

© 2012 T.N. Zamay¹, G.S. Zamay¹, A.S. Zamay¹, O.S. Kolovskaya¹, E.A. Malysheva¹, A.G. Savitskaya¹, A.V. Krat², V.K. Beltyukov², A.A. Modestov², D.B. Popov², L.L. Petrova¹, L.V. Trufanova¹, O.A. Zubkova¹, E.A. Spivak¹

¹ Krasnoyarsk State University named after professor V.F. Voyno-Yasenetskiy

² Krasnoyarsk Regional Clinical Oncological Dispensary named after A.I. Kryzhanovskiy

Work is devoted to the description of method of lung cancer diagnostics by means of one-chained DNA-oligonucleotides, specific to a tumoral lung tissue, received by cell-SELEX technology method. Researches showed that short one-strand DNA are capable to reveal in blood plasma of oncologic patients products of tumoral tissue disintegration and can be used for diagnostics of a lung cancer.

Key words: *diagnostics, lung cancer, DNA-oligonucleotides*

Tatiana Zamay, Doctor of Biology, Professor at the Biochemistry Department. E-mail: tzamay@yandex.ru; Galina Zamay, Post-graduate Student; Anna Zamay, Candidate of Biology, Associate Professor at the Biochemistry Department. E-mail: annazamay@yandex.ru; Olga kolovskaya, Research Fellow of the Scientific Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry. E-mail: zamaykin@gmail.com; Elena Malysheva, Post-graduate Student; Anna Savitskaya, Research Fellow of the Scientific Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry. E-mail: sanna3061@gmail.com; Aleksey Krat, Doctor-Oncologist; Viktor Beltyukov, Doctor-Oncologist; Andrey Modestov, Candidate of Medicine, Head Physician. E-mail: onkolog24@ikrasmail.ru; Dmitriy Popov, Deputy Head Physician; Lyudmila Petrova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Biochemistry Department. E-mail: mi-la0@yandex.ru; Lyudmila Trufanova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Biochemistry Department; Olga Zubkova, Research Fellow of the Scientific Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry. E-mail: 25.12.90.olya@rambler.ru; Ekaterina Spivak, Research Fellow of the Scientific Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry. E-mail: e.spivak@mail.ru