

УДК 577.31

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ КОНЬЮГАТОВ МАГНИТНЫХ НАНОДИСКОВ С ДНК-АПТАМЕРАМИ

© 2016 г. П. Д. Ким, С. С. Замай, Т. Н. Замай, В. С. Прокопенко, О. С. Коловская,
Г. С. Замай, В. Я. Принц, В. А. Селезнев, А. И. Комонов, Е. А. Спивак,
Р. Ю. Руденко, А. В. Дубынина, А. В. Комаров, В. В. Денисенко, М. А. Комарова,
А. Э. Соколов, А. А. Народов, В. П. Живаев, А. С. Замай

Представлено академиком РАН В.Ф. Шабановым 19.01.2015 г.

Поступило 25.05.2015 г.

Описан способ формирования больших массивов (до 10^9 шт.) свободных магнитных Ni-нанодисков толщиной 50 нм, покрытых с обеих сторон слоями Au толщиной 5 нм. Исследовали противоопухолевое действие конъюгатов никелевых магнитных нанодисков, покрытых золотом, с ДНК-аптамерами в условиях *in vivo* и *in vitro*. Исследуемые нанодиски под влиянием вращающегося магнитного поля способны вызывать гибель асцитных клеток карциномы Эрлиха.

DOI: 10.7868/S0869565216050248

Технологии с использованием магнитных наночастиц активно применяются в медицинских и биологических исследованиях, что обусловлено наличием у них уникальных оптических, электрических и магнитных свойств [1]. Управляемые магнитным полем частицы используются как для адресной доставки лекарств, так и для механического разрушения клеток-мишеней. Основными направлениями биомедицинских исследований с использованием магнитных наночастиц являются индукция апоптоза раковых клеток, анализ веществ в биологических жидкостях и тканях и сортировка клеток [2–4]. Наиболее перспективными

материалами для медицинских исследований в области клеточной хирургии являются наночастицы с небольшой остаточной намагниченностью. Перспективы использования пермаллоевых нанодисков с вихревой структурой намагниченности для нанохирургии впервые были показаны на культуре клеток глиомы головного мозга [5].

В настоящей работе описываются противоопухолевые свойства никелевых нанодисков с дипольной структурой намагниченности, подвергнутых воздействию переменного магнитного поля и модифицированных биораспознающими молекулами. В качестве последних выступают ДНК-аптамеры. Аптамеры – это фрагменты однонитевой РНК или ДНК, образующие трехмерные структуры при взаимодействии комплементарных участков цепи, которые благодаря уникальной конформации могут связываться с мишенями, специфическими для данного аптамера [6]. Цель наших экспериментов состояла в определении перспектив использования нанодисков, модифицированных ДНК-аптамерами, для адресной клеточной хирургии онкологических заболеваний. Для связывания магнитных дисков с асцитными клетками использовали ДНК-аптамеры (AS9), структура и функция которых представлена в работе [7].

Способ формирования больших массивов свободных магнитных Ni-нанодисков толщиной 50 нм, покрытых с обеих сторон слоями Au толщиной 5 нм, включал следующие этапы: формирование на подложке полимерного слоя толщиной 300 нм; разделение полимерного слоя с помо-

*Красноярский научный центр
Сибирского отделения
Российской Академии наук*

*Красноярский государственный медицинский
университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого*

E-mail: tzamay@yandex.ru

*Сибирский федеральный университет,
Красноярск*

*Институт химии и химической технологии
Сибирского отделения*

Российской Академии наук, Красноярск

*Институт физики полупроводников
им. А.В. Ржанова*

Сибирского отделения

Российской Академии наук, Новосибирск

Институт физики им. Л.В. Киренского

Сибирского отделения

Российской Академии наук, Красноярск

*Красноярский государственный
педагогический университет*

им. В.П. Астафьева

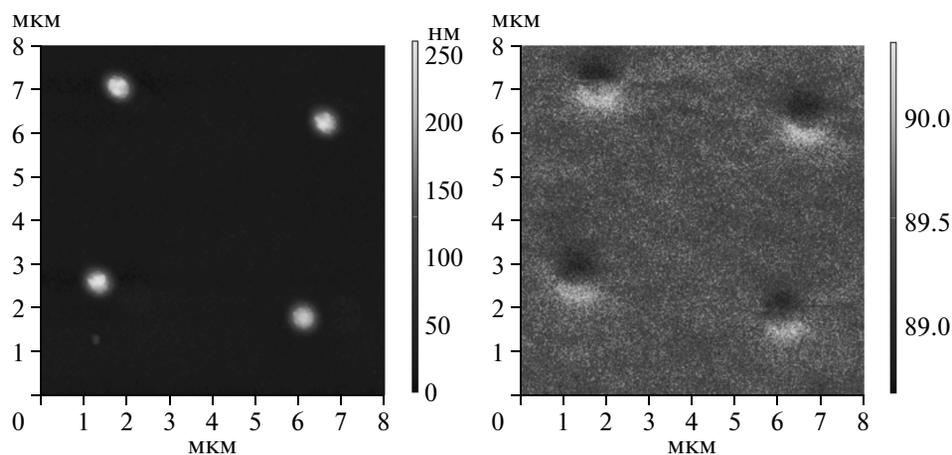


Рис. 1. Результаты исследования свойств магнитных дисков с помощью атомно-силовой микроскопии. Слева – расположение и размеры дисков на полимерных островках. Справа – магнитные диполи тех же дисков, сформировавшихся после их намагничивания в магнитном поле 0.5 Тл.

стью штампа на островки диаметром 500 нм; последовательное напыление слоев Au–Ni–Au на островки; освобождение напыленных Au–Ni–Au-дисков при растворении полимерных островков и их перенос в ацетон. Штамповку осуществляли на установке штамповой нанолитографии Eitre 6 (“Obducat AB”, Швеция), используя штамп, позволяющий получать на подложке площадью 30 см² до 10⁹ островков. Используемая технология включает оптимизацию условий напыления, штамповки и растворения полимерных островков. Для измерения размеров и магнитных свойств нанодисков использовали сканирующий атомно-силовой микроскоп Солвер Р47-PRO (“НТ-МДТ”, Россия) с магнитными кантилеверами. На рис. 1 слева представлены светлые области, соответствующие нанодискам, расположенным на полимерных островках, справа – магнитные диполи дисков, сформировавшиеся после их намагничивания в параллельной плоскости дисков в магнитном поле с индукцией 0.5 Тл. Минимальная величина поля, при котором происходило перенамагничивание нанодисков, составляла 0.3 Тл.

Магнитные нанодиски, отделенные от подложки, трижды промывали в фосфатно-солевом буфере в модификации Дульбекко (DPBS) путем центрифугирования в течение 15 мин при 15000 g и затем модифицировали аптамерами. Для этого праймеры с тиоловыми группами инкубировали с ДНК-аптамерами, часть из которых содержала флуоресцентную метку FITC в эквимольных концентрациях (300 нМ), в течение 18 ч при 4°С для получения гибридов. Далее к раствору добавляли 30 мМ раствор Трис-НСlO₄-буфера (рН 8.6) в соотношении Трис-НСlO₄-буфер : ДНК-гибрид, равном 1 : 3, смешивали с магнитными нанодисками из расчета 10⁶ молекул гибрида на один диск и инкубировали в течение 24 ч при тем-

пературе 4°С. После инкубации нанодиски с иммобилизованными на их поверхности аптамерами промывали с помощью DPBS-буфера.

В опытах использовали мышей-самцов аутбредного стока ICR, полученных из питомника ГНЦ ВБ “ВЕКТОР” (п. Кольцово Новосибирской обл.). Объектом исследования служили асцитные клетки перевиваемой карциномы Эрлиха. Для связывания клеток с дисками к 20 мкл DPBS-буфера, содержащего 10 тыс. асцитных клеток, добавляли 5 мкл DPBS-буфера, содержащего 50 тыс. модифицированных нанодисков (из расчета 5 дисков на клетку). Через 30 мин инкубации, необходимых для связывания нанодисков с асцитными клетками, пробирки с клетками помещали на 20 мин во вращающееся магнитное поле. Через 90 мин исследовали функциональное состояние асцитных клеток с помощью конфокального микроскопа FluoView FV10i (“Olympus”, Япония). В качестве контроля использовали 4 образца асцитных клеток: на клетки воздействовали магнитным полем в течение 20 мин; клетки с немодифицированными магнитными дисками; клетки с ДНК-аптамерами, на которые воздействовали магнитным полем в течение 20 мин; клетки с иммобилизованными на их поверхности нанодисками, модифицированными ДНК-аптамерами в отношении 1 : 5 (клетки : нанодиски) без воздействия магнитного поля. Функциональное состояние асцитных клеток в контрольных образцах анализировали с помощью конфокального микроскопа FluoView FV10i. Контрольные и опытные образцы исследовали в трех опытах.

С помощью сканирующей атомно-силовой микроскопии мы установили, что магнитный момент направлен параллельно плоскости диска (рис. 1). Расчеты показали, что модуль магнитного момента нанодиска составляет примерно 10–15 А · м² и не изменяется под влиянием слабого

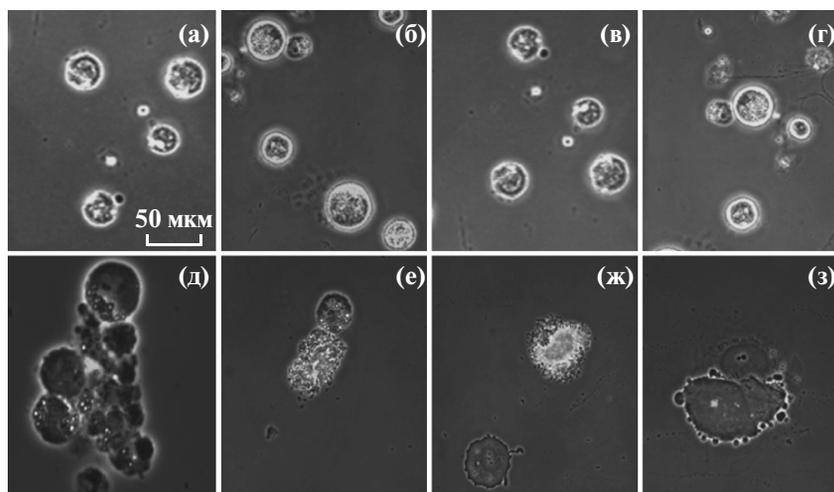


Рис. 2. Влияние магнитных нанодисков, модифицированных ДНК-аптамерами во вращающемся магнитном поле, на асцитные клетки карциномы Эрлиха. Изменение морфологии клеток регистрировали через 90 мин после воздействия вращающегося магнитного поля. (а) – асцитные клетки, на которые воздействовали магнитным полем в течение 20 мин; (б) – асцитные клетки с немодифицированными магнитными дисками; (в) – асцитные клетки с ДНК-аптамерами, на которые воздействовали магнитным полем в течение 20 мин.; (г) – асцитные клетки с иммобилизованными на их поверхности нанодисками, модифицированными ДНК-аптамерами в отношении 1 : 5 (клетки : нанодиски) без воздействия магнитного поля. Во всех контрольных образцах разрушенные клетки практически отсутствуют. (д–з) – асцитные клетки карциномы Эрлиха с иммобилизованными на их поверхности магнитными нанодисками, модифицированными ДНК-аптамерами, через 90 мин после воздействия на них вращающегося магнитного поля. В образцах наблюдаются случаи некроза и апоптоза.

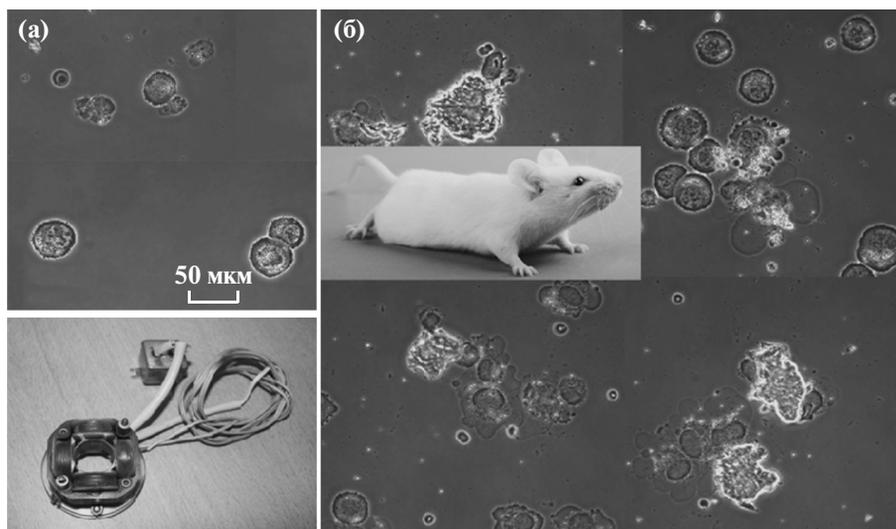


Рис. 3. Асцитные клетки карциномы Эрлиха, выделенные из асцитической жидкости контрольных мышей (а) и мышей (б), которым вводили модифицированные ДНК-аптамерами магнитные нанодиски через 90 мин после предварительного воздействия вращающегося магнитного поля. Наблюдаются случаи некроза и апоптоза.

внешнего магнитного поля (ВМП). При индукции ВМП, равной 0.01 Тл, на диск действуют силы, момент которых равен примерно 10^{-17} Н · м. На прикрепившийся к клетке диск действуют силы упругости мембраны. Момент этих сил меньше 10^{-18} Н · м и не может помешать повороту диска в направлении ВМП. Сильное растяжение мембраны приводит к ее повреждению. В проведенных исследованиях модифицированные ДНК-аптамерами магнитные нанодиски запускали в культуре ас-

цитных клеток процессы клеточной гибели, в контрольных пробах гибели асцитных клеток мы не наблюдали (рис. 2).

Для исследования противоопухолевого действия магнитных нанодисков в условиях *in vivo* мышам с асцитной карциномой Эрлиха в брюшную полость в 300 мкл DPBS-буфера вводили по 10 млн нанодисков, модифицированных ДНК-аптамерами. Контрольным мышам вводили по 300 мкл DPBS-буфера. Через 30 мин мышам по-

мещали в установку, генерирующую вращающееся магнитное поле 0.01 Тл. Время действия ВМП составляло 20 мин. Через 60 мин после воздействия ВМП у опытных и контрольных животных производили забор асцитных клеток. Клетки отмывали дважды DPBS-буфером и исследовали их функциональное состояние на конфокальном микроскопе FluoView FV10i.

Действие модифицированных нанодисков в условиях *in vitro* и *in vivo* было аналогичным: в образцах асцитных клеток, выделенных из мышей-опухоленосителей наблюдали разрушение опухолевых клеток, несмотря на то, что соотношение дисков и клеток в карциноме Эрлиха составляло примерно 1 : 10 (диски : клетки, рис. 3), что свидетельствовало о высокой эффективности модифицированных ДНК-аптамерами никелевых магнитных нанодисков и вращающихся магнитных полей для адресной клеточной хирургии.

Таким образом, простые технологии получения нанодисков и их модификация ДНК-аптамерами открывают новое направление междисциплинарных исследований, нацеленных на разработку биологически функциональных гибридных наноустройств на основе металлов, магнитных материалов и ДНК-аптамеров, адресно взаимодействующих с молекулярно-клеточными мишенями, и соответствующих приборов и методов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 14–15–00805).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giannaccini M., Giannini M., Calatayud M. P., Goya G.F., Cuschieri A., Dente L., Raffa V.* Magnetic Nanoparticles as Intraocular Drug Delivery System to Target Retinal Pigmented Epithelium (RPE) // *Intern. J. Mol. Sci.* 2014. № 15. P. 1590–1605.
2. *Wen J., Jiang S., Chen Z., Zhao W., Yi Y., Yang R., Chen B.* Apoptosis Selectively Induced in Bel-7402 Cells by Folic Acid-Modified Magnetic Nanoparticles Combined with 100 Hz Magnetic Field // *Intern. J. Nanomed.* 2014. V. 9. P. 2043–2050.
3. *Chiang C.-L., Sung C.-S.* Purification of transfection-grade plasmid DNA from bacterial cells with superparamagnetic nanoparticles // *J. Magnetism and Magnetic Materials.* 2006. № 302. P. 7–13.
4. *Першина А.Г., Сазонов А.Э., Филимонов В.Д.* Взаимодействие магнитных наночастиц и молекул ДНК: создание нанобиогридных структур и их использование // *Успехи химии.* 2014. Т. 83. № 4. С. 299–322.
5. *Kim D.-H., Rozhkova E. A., Ulasov I.V., Bader S.D., Rajh T., Lesniak M.S., Novosad V.* Biofunctionalized Magnetic-Vortex Microdiscs for Targeted Cancer-Cell Destruction // *Nature Materials.* 2010. V. 9. P. 165–171.
6. *Радько С.П., Рахметова С.Ю., Бодоев Н.В., Арчаков А.И.* Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики // *Биомед. химия.* 2007. Т. 53. В. 1. С. 5–24.
7. *Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Zamay A.S., Glazyrin Y.E., Spivak E.A., Zubkova O.A., Kadkina A.V., Erkaev E.N., Zamay G.S., Savitskaya A.G., Trufanova L.V., Petrova L.L., Berezovsky M.V.* DNA-Aptamer/Protein Interaction as a Cause of Apoptosis and Arrest of Proliferation in Erlich Ascites Adenocarcinoma Cells // *Biochemistry. Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biol.* 2014. V. 8. № 1. P. 60–72.