

годных для их последующей конденсации с другими биомолекулами или МНЧ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 14-03-00146-а) и УрО РАН (№ 15-21-3-6).

*А. М. Дёмин¹, А. Г. Першина², В. В. Иванов²,
О. Б. Шевелев³, К. В. Невская², Д. О. Ащеулова²,
В. П. Краснов¹, А. Э. Сазонов², Л. М. Огородова²*

СИНТЕЗ НАНОГИБРИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ Fe_3O_4 , ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ рН-ЗАВИСИМЫМ ПЕПТИДОМ (рНЛIP), ДЛЯ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЗОН ЛОКАЛЬНОГО АЦИДОЗА

¹ФГБУН «ИОС им. И. Я. Постовского УрО РАН», Екатеринбург;

²ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск;

³ФГБНУ ИЦГ СО РАН, Новосибирск

Введение. Пептиды рНЛIPs (pH Low Insertion Peptides) – класс гидрофобных пептидов, способных встраиваться в мембраны клеток при низких значениях рН. Известно, что опухолевые ткани имеют пониженную рН межклеточного пространства. Поэтому рНЛIP может служить молекулярным вектором для транспортировки лекарственных веществ или, например, магнитных наночастиц (МНЧ) в опухоль. Таким образом, можно получить высокоэффективные диагностические препараты для использования в онкологии.

Цель исследования – разработка нанобиогибридной конструкции на основе МНЧ, модифицированных силановыми производными и функционализированных за счет формирования ковалентной связи с рН-чувствительным пептидом, предназначенной для выявления зон локального ацидоза *in vivo* методом магнитно-резонансной (МР) томографии.

Материалы и методы. Для получения нанобиогибридной конструкции использовали МНЧ Fe_3O_4 диаметром 10 нм, полученные методом осаждения из растворов солей Fe^{3+} и Fe^{2+} . Наночастицы охарактеризованы методами инфракрасной спектроскопии, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, динамического рассеяния света. Проведены исследования МР-контрастных свойств *in vitro* и *in vivo* (Bruker, Biospec 117/16 USR, Германия).

Результаты. МНЧ модифицировали 3-аминопропилсиланом, далее проводили конденсацию малеимидного кросс-линкера EMCS, имеющего активированную гидроксисукцинимидом карбоксильную группу, с аминоклассами на поверхности МНЧ. Иммунизация рНЛIP на МНЧ проведена за счет нуклеофильного присоединения SH-группы L-Cys данного пептида к двойной связи остатка малеимида. В результате получена нанобиогибридная конструкция МНЧ – рНЛIP, в которой пептид закреплен на поверхности ковалентно. МР-контрастные свойства МНЧ подтверждены исследованиями *in vitro* и *in vivo*, эффективное контрастирование патологической ткани достигается при введении наноконъюгата в дозе 0,6 мг/кг, сопоставимой с дозами введения ряда коммерческих препаратов, например Feridex. По данным ЛДГ- и МТТ-тестов полученный наноконъюгат в концентрации до 40 мкг/мл не оказывал выраженного токсического действия *in vitro* на клетки линии НТС.

Заключение. Проведена иммобилизация рНЛIP на МНЧ на основе Fe_3O_4 . рНЛIP был закреплен на поверхности 3-аминопропилсилан-модифицированных МНЧ при использовании гетерофункционального линкера EMCS. Полученные МНЧ-рНЛIP малотоксичны, а по своим МР-контрастным свойствам сопоставимы с рядом коммерческих препаратов и могут быть использованы для создания в дальнейшем препаратов для МР-диагностики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00247).

*А. М. Дёмин¹, А. Г. Першина², А. Э. Сазонов²,
Л. М. Огородова², В. П. Краснов¹*

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ПЕПТИДАМИ И БЕЛКАМИ

¹ФГБУН «ИОС им. И. Я. Постовского УрО РАН», Екатеринбург;

²ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск

Введение. Наноматериалы на основе магнитных наночастиц (МНЧ), в первую очередь Fe_3O_4 , часто используются как диагностические (в том числе для магнитно-резонансной томографии или магнитной релаксометрии) и терапевтические (гипертермия) агенты, в качестве систем фармацевтической доставки лекарственных средств, применяемых в онкологии и других областях.

Цель исследования – разработка подходов к модификации МНЧ пептидами и белками визуализирующих диагностических агентов и препаратов для терапии онкологических заболеваний.

Материалы и методы. В работе использованы МНЧ на основе Fe_3O_4 диаметром 10 нм, полученные методом осаждения из растворов солей Fe^{3+} и Fe^{2+} . МНЧ предварительно функционализировали 3-аминосиланом (МНЧ- NH_2) (ковалентно) или N-(фосфонометил)аминодиуксусной кислотой (МНЧ- $COOH$) (нековалентно). В работе использованы методы инфракрасного, ультрафиолетового излучения, флуориметрии и масс-спектропии высокого разрешения и др.

Результаты. Иммунизацию на функционализированные МНЧ можно проводить путем конденсации аминокислотных или карбоксильных групп на их поверхности со свободными карбоксильными или аминоклассами белка (или пептида) соответственно при использовании карбодиимидов. На примере конъюгации МНЧ с рНЛIP флуоресцентным белком TagGFP2 и антителами к CD117 изучены процесс иммунизации пептидов и белков на поверхность МНЧ при использовании 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и возможность протекания побочных процессов, связанных с поликонденсацией молекул пептидов и белков в присутствии карбодиимида. Реакции проводили в фосфатном буферном растворе (рН 7,5) при использовании эквивалентных количеств EDC в расчете на количество функциональных групп на поверхности МНЧ. В случае МНЧ- $COOH$ на 1-м этапе проводили активацию карбоксильных групп EDC, после чего добавляли соответствующий аминокласс. В случае МНЧ- NH_2 EDC добавляли в реакционную массу в присутствии карбоксильной компоненты.

Заключение. Разработаны химические подходы к получению МНЧ-конъюгатов с пептидами и белками. Пока-

зано, что в выбранных условиях возможность протекания побочных процессов поликонденсации незащищенных пептидов и белков при использовании карбодимидов незначительна.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00247) в части синтеза и МРТ-исследований наноконъюгатов МНЧ-рHLIP и TagGFP2. А также РФФИ (№ 14-03-00146-а) и УрО РАН (№ 15-21-3-6) в части синтеза наноконъюгатов МНЧ-CD117.

А.С. Дерюжкин¹, Ю.Н. Потапов²

СРАВНИТЕЛЬНОЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОРТАНИ И ЛЕГКОГО

¹БУЗ ВО ВОПБ, Воронеж;

²БУЗ ВО ВОКОД, Воронеж

Введение. С определенным допущением можно сказать, что плоскоклеточный рак гортани и легкого представлен разными клеточными популяциями. Это следует, например, из различий в эффективности лучевой и химиотерапии при лечении больных раком гортани и легкого одинакового гистогенеза.

Цель исследования — выявление различий в пролиферации клеток плоскоклеточного рака гортани и легкого.

Материалы и методы. Исследованы опухоли 180 больных плоскоклеточным раком гортани и 160 пациентов с плоскоклеточным раком легкого. После рутинного гистологического исследования и подтверждения диагноза плоскоклеточного рака методом иммуногистохимического анализа срезы части опухолей окрашивали антителами к Ki67 и p53. В готовых препаратах определяли долю позитивных к данным антителам опухолевых клеток.

Результаты. В популяциях исследованных опухолей обеих локализаций имело место практически отсутствие новообразований высокой и низкой степеней дифференцировки. Среди опухолей гортани было 2 случая высокодифференцированного рака и 1 — низкодифференцированного. Среди опухолей легкого выявлены 4 случая рака высокой степени дифференцировки и 2 случая низкой степени дифференцировки. Средняя доля Ki67-положительных клеток составила соответственно 17,5 и 25,0 % в высокодифференцированных новообразованиях гортани и легкого. В низкодифференцированных опухолях гортани и легкого доля Ki67-положительных клеток была равна соответственно 80 и 70 %. При сравнении двух групп, включавших по 15 случаев умеренно-дифференцированного рака гортани и легкого, выявлено, что пролиферативная активность клеток в этих новообразованиях практически не различалась: средний Ki67 при раке гортани составил 49,2 % при разбросе от 30 до 70 %, при раке легкого — 50,2 % (колебания 43–72 %). Экспрессия мутантного гена p53 имела место во всех исследованных случаях умеренно-дифференцированного рака гортани со средней долей клеток в опухоли 48,9 % (колебания 10–70 %). В 4 из 15 случаев умеренно-дифференцированного рака легкого клетки опухоли не экспрессировали мутантный ген p53, а в 11 опухолях среднее количество клеток с его гиперэкспрессией составила 47,1 % (разброс 17–97 %).

Заключение. Среди популяций плоскоклеточного рака гортани и легкого преобладают умеренно-дифференцированные новообразования, в которых нет зависимости интенсивности клеточного деления от локализации опухоли. Популяция умеренно-дифференцированного рака легкого более гетерогенна по способности клеток к p53-опосредованному апоптозу, но в опухолях, где имеются клетки, экспрессирующие этот антиген, доля таких клеток одинакова в новообразованиях обеих локализаций. Отсутствие значимых отличий по параметрам пролиферации клеток при раке гортани и легкого позволяет предположить, что их различная чувствительность к цитотоксическим воздействиям определяется другими характеристиками клеточных популяций.

Е.В. Долгова, Е.А. Поттер, А.С. Проскурина, С.С. Богачев
СВОЙСТВО СТЕЛОВЫХ ИНИЦИИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК ИНТЕРНАЛИЗОВАТЬ ЭКЗОГЕННУЮ ДВУЦЕПОЧЕЧНУЮ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВУЮ КИСЛОТУ И ЕГО ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
ФГБНУ ИЦГ СО РАН, Новосибирск

Введение. В настоящее время общепризнанной остается модель строения опухоли, где на вершине иерархической лестницы находятся стволовые иницирующие раковые клетки (СИРК). Основными свойствами, характерными для СИРК, являются самоподдержание в ряду неограниченного числа делений, способность производить коммитированную дочернюю клетку, устойчивость к многократной пересадке с сохранением гистологических характеристик опухоли. Индивидуализация СИРК в массе опухолевых клеток является необходимым условием терапевтического изменения статуса раковой клетки или ее прямой элиминации.

Цель исследования — поиск принципиально нового универсального маркера низкодифференцированных клеток различного генеза, включая СИРК, и характеристика возможных направлений его применения в диагностике и лечении онкологических заболеваний.

Материалы и методы. Экспериментальными моделями исследования являлись мышьяная опухоль Кребс-2, а также человеческая глиома. В качестве экзогенной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) использовали меченную флуорофором TAMRA ДНК человеческого *Alu*-повтора. В исследовании использовались современные молекулярные и цитологические методы работ, такие как проточная цитометрия, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, а также физиологические методы работы с лабораторными животными.

Результаты. В настоящей работе впервые показано, что в различных сообществах активно пролиферирующих клеток млекопитающих присутствует популяция клеток, способная интернализировать фрагменты двуцепочечной ДНК (TAMRA-позитивные клетки), и что эта популяция в сообществах раковых клеток обладает признаками СИРК. Впервые приводятся данные (на модели опухоли Кребс-2) о том, что совместная обработка цитостатиком циклофосфаном и препаратом двуцепочечной ДНК приводит к эрадикации туморогенных свойств перевиваемого графта,