

**Коловская Ольга Сергеевна**

АДРЕСНАЯ КОРРЕКЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ  
МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ  
КОНСТРУКЦИЯМИ С РАСПОЗНАЮЩИМИ ЭЛЕМЕНТАМИ –  
ДНК-АПТАМЕРАМИ

1.5.4 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Новосибирск - 2023

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения России и Федеральном исследовательском центре Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук.

**Научный консультант:**

Доктор медицинских наук, профессор Зуков Руслан Александрович

**Официальные оппоненты:**

Кондакова Ирина Викторовна доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии опухолей НИИ онкологии Томского НИМЦ

Амстиславская Тамара Геннадьевна доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией трансляционной биопсихиатрии Научно-исследовательского института нейронаук и медицины

Кручинина Маргарита Витальевна доктор медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии НИИ ТПМ - филиал ИЦиГ СО РАН

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский научный центр рентгенорадиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.242.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ) и на сайте <https://frcftm.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Русских Галина Сергеевна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Злокачественные новообразования до настоящего времени остаются одной из лидирующих причин смертности трудоспособного населения и важной проблемой общественного здравоохранения (Ferlay J., 2018; Siegel R.L., 2020). Несмотря на развитие новых методов диагностики онкологических заболеваний и противоопухолевой терапии по данным Globocan доля смертельных исходов из числа всех онкобольных превышает 40% (Siegel R.L., 2020).

Ведущими методами локальной терапии злокачественных новообразований остаются хирургия и лучевая терапия, основным недостатком которых является их высокая инвазивность. Как хирургическое вмешательство, так и радиотерапия повреждают окружающие опухоль здоровые ткани, что особенно опасно при лечении глиальных опухолей головного мозга (Арсеньев А.И. и др., 2017; Rueth N.M. et al., 2012; Lackey A., Donington J.S., 2013; Kim D. et al., 2022). Другим недостатком этих методов является невозможность радикального удаления всех опухолевых клеток, поскольку микрометастазы, макроскопически незаметные для хирурга, впоследствии могут стать очагом формирования рецидивной опухоли (Tohme S. et al., 2017).

Естественная и насущная потребность в повышении эффективности и снижении степени токсичности и инвазивности лечения в сочетании с достижениями и возможностями биомедицины, биофармацевтики и нанотехнологий привела к возникновению новой отрасли медицины – наномедицины (Медведева Н. В. и др., 2006; Ventola C.L., 2012), методы и технологии которой нацелены на создание и применение медицинских изделий для дифференциальной диагностики заболеваний и адресной терапии на молекулярно-клеточном уровне. В последнее десятилетие в области терапии злокачественных новообразований, в основе которой лежит целенаправленное воздействие на ключевые молекулы, стимулирующие рост и прогрессирование опухоли, достигнуты значительные успехи (Ventola C.L., 2012).

Основными направлениями наномедицины стали ранняя и точная диагностика и медицинская визуализация, снижение нагрузки на организм от хирургии и радиотерапии, уменьшение дозировки традиционных противоопухолевых лекарственных средств и поиск инновационных неинвазивных решений для персонализированного лечения (Горобец С.В., Горобец О.Ю., 2007; Арчаков А.И., 2010).

### **Степень разработанности темы исследования**

Несмотря на то, что за последние годы в области наномедицины достигнут значительный технологический успех, это не позволило решить все проблемы и разработать эффективную платформу для таргетной терапии

онкологических заболеваний. В первую очередь, это связано с наличием неустранимых проблем современных нанотерапевтических подходов, в том числе с высоким риском побочных эффектов химиотерапии, ядерной медицины, сложностью и дорогостоящей технической реализации и эксплуатации. Пришло понимание того, что бионаноматериалы, которые могут быть использованы в наномедицине в качестве противоопухолевых препаратов, должны обладать биосовместимостью без системных побочных эффектов, накапливаться в клетках-мишенях, обладать точной реакцией на внешние и внутренние сигналы, иметь долговременную стабильность в системе кровообращения и др. (Ventola C.L., 2012).

Одной из наиболее острых проблем наномедицины является адресное (активное) нацеливание на патологическую молекулярную мишень. Эффективное решение этой проблемы может быть достигнуто только с помощью создания нанопрепаратов, конъюгированных с молекулярными распознающими лигандами. В настоящее время наибольшее распространение в качестве молекулярных распознающих лигандов получили моноклональные антитела (Hamilton G.S., 2015), применение которых имеет ряд недостатков (Chames P. et al., 2009). Благодаря достигнутым успехам в области молекулярной биологии стало понятно, что наиболее приемлемой заменой моноклональным антителам могут стать их синтетические функциональные аналоги – аптамеры, представляющие собой одностебельные олигонуклеотиды (размером 30-80 нуклеотидов) или пептиды, способные к специфичному связыванию с любыми молекулярными и клеточными мишенями: белками, малыми органическими молекулами, вирусными частицами, бактериями, антителами, целыми клетками, клеточными лизатами и даже тканями (Ellington A.D., Szostak J.W., 1990). Именно аптамеры, которые можно легко подобрать к любой заданной мишени, обладают наиболее подходящими характеристиками для адресного нацеливания на опухоль.

Немаловажным преимуществом аптамеров по сравнению с моноклональными антителами является то, что эти молекулы производятся химически в легко масштабируемом процессе, их синтез не подвержен вирусному или бактериальному загрязнению, они неиммуногенны и нетоксичны. Малые размеры аптамеров позволяют им эффективно проникать в любые опухоли, они обратимо денатурируют с восстановлением нужной конформации, кроме того их можно химически модифицировать без нарушения нужной конформации (Lakhin A.V., et al., 2013; Ni S., et al., 2021). При этом производство аптамеров примерно в 100 раз дешевле, чем производство моноклональных антител.

Аптамеры получают с использованием технологии SELEX, позволяющей осуществлять направленный отбор олигонуклеотидов, обладающих сродством к заданным биологическим мишеням (Ellington A.D., Szostak J.W., 1990).

## **Цель исследования**

Разработать подходы к эффективной и малоинвазивной диагностике и терапии онкологических заболеваний, основанные на многофункциональных молекулярных конструкциях с адресными распознающими элементами – ДНК-аптамерами.

## **Задачи исследования**

1. Селекция молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров, аффинных и специфичных к асцитным клеткам карциномы Эрлиха.
2. Оценка чувствительности и специфичности ДНК-аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха *in vivo* с помощью стандартных методов медицины (ПЭТ/КТ, МРТ).
3. Разработка наноконструкций с адресной доставкой к опухоли на основе молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров и золотых наночастиц для разрушения злокачественных опухолей методом гипертермии.
4. Разработка методов дистанционного адресного малоинвазивного способа разрушения опухолевых клеток *in vivo* с помощью магнитомеханической трансдукции с использованием магнитных наночастиц, функционализированных ДНК-аптамерами.
5. Разработка средств адресной доставки стандартных противоопухолевых препаратов (циклофосфида и цисплатина) для снижения их токсичности и увеличения терапевтического эффекта.

## **Научная новизна работы**

1. Впервые получены молекулярные распознающие элементы на основе ДНК-аптамеров AS9, AS14 и AS42, высокочувствительных и высокоспецифичных асцитным клеткам карциномы Эрлиха.
2. Впервые показано, что с помощью радиофармпрепарата  $^{11}\text{C}$ -AS14, адресно связывающегося с асцитными клетками, можно *in vivo* выявлять опухолевые очаги и их метастазы методом ПЭТ/КТ.
3. Впервые показано, что покрытые арабиногалактаном и функционализированные ДНК-аптамерами к асцитным клеткам суперпарамагнитные наночастицы способны *in vivo* выявлять первичные опухолевые очаги и их метастазы методом МРТ.
4. Впервые получены комплексы золотых наночастиц (37 нм) с ДНК-аптамерами к асцитным клеткам (AS42), способные *in vivo* осуществлять адресную плазмонную фототермическую терапию карциномы Эрлиха.
5. Впервые показано, что дистанционно управляемые биобезопасным низкочастотным переменным магнитным полем ферроарабиногалактаны,

магнитные наночастицы (NITmagoldCit 50nm) и трехслойные магнитные нанодиски (Au/Ni/Au) с квазидипольной структурой, функционализированные ДНК-аптамерами к асцитным клеткам, способны осуществлять целевое разрушение асцитной карциномы Эрлиха *in vivo*.

6. Впервые показано, что ДНК-аптамеры способны адресно доставлять конъюгаты циклофосфида с арабиногалактаном к опухолевым очагам, снижая токсичность и увеличивая эффективность стандартной противоопухолевой терапии *in vivo*.

7. Впервые показано, что целевая доставка конъюгатов цисплатина с арабиногалактаном к злокачественной опухоли с помощью ДНК-аптамеров снижает токсичность и увеличивает эффективность стандартной противоопухолевой терапии *in vivo*.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Молекулярные распознающие элементы – ДНК-аптамеры обладают высокой степенью чувствительности и специфичности к опухолевым клеткам асцитной карциномы Эрлиха.

2. Радиофармпрепарат  $^{11}\text{CH}_3\text{-AS14}$  и магнитные наночастицы, функционализированные ДНК-аптамерами, способны связываться с опухолевыми клетками *in vivo* и осуществлять визуализацию опухолевых очагов и их метастазов методами МРТ и ПЭТ/КТ.

3. Плазмонная фототермическая терапия золотыми наночастицами, функционализированными ДНК-аптамерами к асцитным клеткам карциномы Эрлиха (AS42-AuНЧ) разрушает солидные опухоли *in vivo*.

4. Магнитные наночастицы и микродиски, функционализированные целевыми ДНК-аптамерами, под влиянием низкочастотного переменного магнитного поля разрушают солидные опухоли в условиях *in vivo*.

5. Адресная доставка стандартных противоопухолевых препаратов (цисплатина и циклофосфида) к опухолевым клеткам увеличивает эффективность препаратов и снижает их токсичность.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость работы заключается в оптимизации и модификации метода селекции ДНК-аптамеров к клеткам злокачественных опухолей и создании на их основе наноконструкций для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Разработанные технологии получения наноконструкций для адресной доставки средств терапии являются теоретической основой для создания противоопухолевых препаратов.

Практическая значимость основана на том, что полученные аптамеры используются в научно-исследовательской работе в Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий на базе КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России и Лаборатории цифровых управляемых лекарств и тераностики ФИЦ КНЦ СО РАН для создания средств тераностики рака легкого и глиобластомы. Технология получения

противоопухолевых препаратов на основе ДНК-аптамеров к экспериментальной опухоли мышей позволяет её транслировать для получения препаратов для диагностики и терапии других онкологических заболеваний.

### **Степень достоверности результатов**

Результаты получены на современном оборудовании с использованием стандартизированных методик и программ. Селекция аптамеров проведена с использованием термоциклера SensoQuest (Германия), Eppendorf (США). Контроль селекции аптамеров осуществляли с использованием геледокументирующей системы GBOX/EF2-E. Секвенирование последовательностей аптамеров было проведено «Génome Québec Innovation Centre» (Канада). Последовательности аптамеров были синтезированы «Integrated DNA Technologies» (США). Определение чувствительности и специфичности аптамеров проводили на проточном цитометре Beckman Coulter FC-500, Galios (США). Результаты проанализированы с помощью программного обеспечения: Kaluza 1.1, MaxQuant 1.3, SIMCA, FlowJo, FlowingSoftware 2.5.1, Microsoft Excel 2007, Origin 6.0, базе данных UniProtKB/Swiss-Prot. Результаты работы опубликованы в рецензируемых журналах и представлены на всероссийских и международных конференциях.

### **Внедрение результатов исследования**

ДНК-аптамеры и разработанные на их основе наноконструкции используются при создании новых диагностических систем и терапевтических средств для глиобластомы головного мозга человека и рака легкого человека в Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий (БиоMeТ) в КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Россия) и Лаборатории управляемых цифровых лекарств и тераностики ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск, Россия).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 287 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 89 рисунками, 6 таблицами. В список литературы включено 4 отечественных и 348 зарубежных источника литературы.

### **Апробация работы**

Результаты исследования доложены на международных и российских конференциях в виде устных и постерных докладов: «13th Tetrahedron Symposium-Asia Edition», Тайвань (2012); «Eura 2013 Scientific Meeting», Франция (2013); «9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society», Италия (2013); «1st International Symposium and Exhibition Aptamers»,

Великобритания (2014); «11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society», Нидерланды (2015); «Aptamers in Bordeaux», Франция (2016, 2017, 2018); «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии», Томск (2017); «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Россия (2017, 2019, 2021); «Aptamers in Russia», Россия (2020); «Цифровые лекарства на стыке наук», Россия (2015, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022).

### **Публикации**

Основные положения диссертации опубликованы в 19 статьях, из которых 12 – в зарубежных журналах, 7 – в российских журналах, рекомендованных ВАК, 1 патенте.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно спланированы эксперименты и сформулированы научные гипотезы, лично проведено большинство исследований и проанализированы полученные результаты. Публикации по результатам исследований написаны совместно с коллегами творческого коллектива лаборатории. Все главы диссертации написаны автором самостоятельно.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Исследования были выполнены на базе Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого и Лаборатории цифровых управляемых лекарств и тераностики ФИЦ КНЦ СО РАН. Часть исследований проведена в центре Ядерной медицины ФМБА России. Все манипуляции с животными проводили в строгом соответствии с рекомендациями «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health», одобренными этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Объектом для селекции аптамеров стали клетки перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха. В качестве негативных мишеней использовали клетки крови, печени, почек и селезенки, выделенные у мышей без опухоли.

### **Методы исследования**

Для селекции использовали одноцепочечную библиотеку ДНК-аптамеров (Integrated DNA Technologies, США). Одноцепочечная библиотека ДНК-аптамеров, длина которых составляла 80 нуклеотидов, имела в своей центральной рандомизированной части 40 нуклеотидов (N40), ограниченных с обеих сторон сайтами гибридизации для праймеров длиной 20 нуклеотидов (5'-СТССТССТGTGATAАССАСG-(N)40-GСАТАGGTAGTССАGАAGСС-3'). Праймеры для 5'-конца мечены флуоресцентным красителем Су3 или FAM (5'-/метка /СТССТССТGTGATAА ССАСG-3), немеченые для 3' (5'-



GGCACTTTCTGG ACCTAT GC-3') использовали в ПЦР для синтеза одноцепочечной ДНК в асимметричной ПЦР при селекции аптамеров. Немеченные 5'- и 3'-праймеры использовали для ПЦР в целях получения двуцепочечной ДНК в процессе симметричной ПЦР и при клонировании. Праймер для 5'-конца, меченный биотином, использовали в ПЦР при получении аптамеров и библиотеки, меченных биотином.

Селекцию аптамеров к клеткам асцитной карциномы Эрлиха проводили методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) из оцДНК-библиотеки аптамеров. Первый раунд начинали с библиотеки N40 (Integrated DNA Technologies, США), содержащей оцДНК, в которых центральные 40 нуклеотидов были рандомизированы и фланкированы двумя стандартными последовательностями для связывания праймеров при амплификации (5'-СТС СТСТGACTGTAACCACGN40GCATAGGTAGTCCAGAA GCC-3'). Перед каждым раундом селекции и другими экспериментами оцДНК-библиотеку или пул денатурировали в течение 5 мин при 95°C, после чего ренатурировали на льду в течение 10 мин. Все опыты с клетками проводили в бесцветном фосфатном буфере (DPBS) (Sigma-Aldrich, США) или бесцветной среде Хенкса (Sigma-Aldrich, США). В каждом раунде селекции использовали 1 млн. клеток, разведенных в фосфатном буфере. Всего было проведено 13 раундов селекции, включающих: (1) инкубацию исходной библиотеки аптамеров в первом раунде селекции (1 мкМ) или пула аптамеров (100 нМ), полученного в предыдущем раунде, с негативными мишенями (клетки крови, ткани печени, почек и селезенки); (2) удаление с помощью центрифугирования из пула ДНК-олигонуклеотидов, связавшихся с негативными мишенями, и сбор свободных аптамеров в супернатанте; (3) инкубацию пула аптамеров с клетками асцитной карциномы Эрлиха; (4) отмывку клеток от несвязавшейся ДНК; (5) экстракцию связанных с клетками ДНК-аптамеров с помощью денатурации и центрифугирования; (6) амплификацию пула аптамеров с помощью симметричной и асимметричной ПЦР (Рис.1).

Пулы аптамеров, обладающих наибольшей аффинностью к своим мишеням, были клонированы для разделения на отдельные последовательности ДНК-олигонуклеотидов. Клонирование аптамеров проводили с использованием набора для клонирования «M13mp18 Perfectly Blunt Cloning Kits», подходящего для клонирования любых ДНК-фрагментов, независимо от типа их концов.

Выделенные клоны аптамеров были секвенированы компанией «Génome Québec Innovation Centre» (Канада). Выбор аптамеров для синтеза определяли по результатам проточной цитометрии и расчетам стабильности аптамеров (расчет производился с помощью программного обеспечения OligoAnalyzer 3.1). Последовательности аптамеров по полученным последовательностям были синтезированы компанией «Integrated DNA

technologies» (США). Все дальнейшие исследования проводили с использованием синтетических аптамеров.

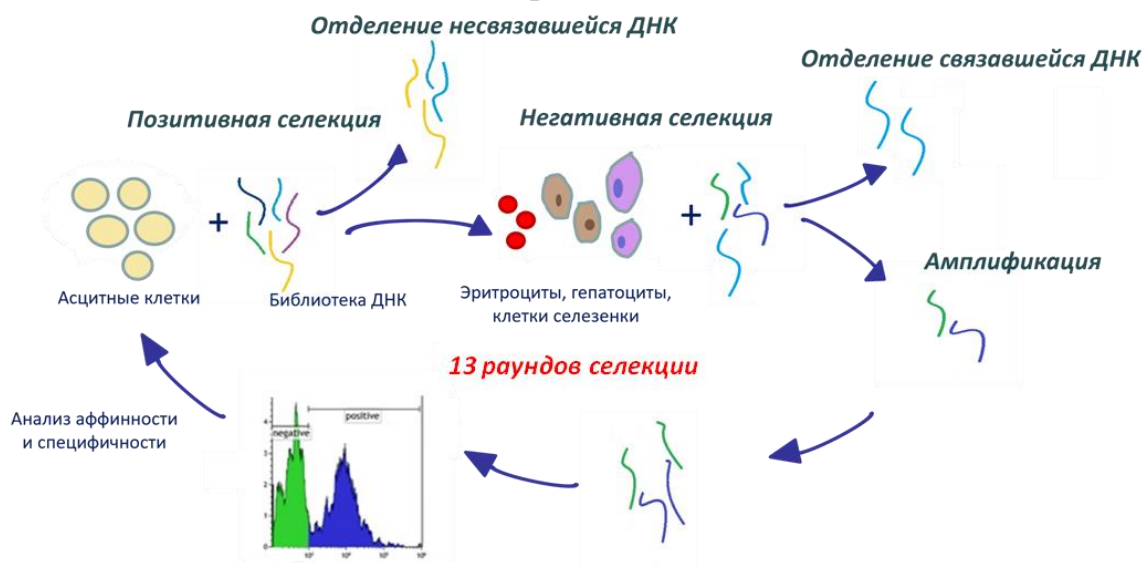


Рисунок 1 – Схема селекции ДНК-аптамеров к асцитным клеткам.

Идентификацию белковых мишеней аптамеров проводили методом аффинного обогащения аптамерами с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения.

Визуализацию опухолей у мышей *in vivo* проводили методами ПЭТ/КТ и МРТ.

Токсичность молекулярных конструкций на основе аптамеров оценивали по показателям биохимического анализа крови.

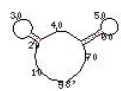
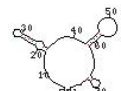
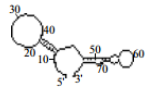
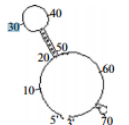
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1 Разработка молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров

Аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха получали по технологии cell-SELEX. Для получения аптамеров к асцитным клеткам проводили 13 раундов обогащения, амплификации и очищения для увеличения аффинности и специфичности к асцитным клеткам. Оценка аффинности и специфичности пулов аптамеров показала, что наибольшую специфичность к асцитным клеткам имели аптамеры 10 раунда селекции. Пул аптамеров 10 раунда селекции был клонирован и секвенирован.

После бактериального клонирования и секвенирования аптамеров 10-го раунда селекции были получены 24 уникальные последовательности олигонуклеотидов, четыре из которых были синтезированы – AS9, AS14, AS18 и AS42. Последовательности нуклеотидов в аптамерах, обладающих наибольшей специфичностью к клеткам карциномы Эрлиха, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха

Аптамер	Последовательность нуклеотидов	Свободная энергия фолдинга $\Delta G$ , ккал/моль	Вторичная структура
AS-9	CTCCTCTGACTGTAACCACGACTGAGCT TTGGTGGGTCGAGCTATGTGCTGCCTCT TCACGCATAGGTAGTCCAGAAGCC	-7.59	
AS-14	CTCCTCTGACTGTAACCACGAAGGTGTC GGCCTTAGTAAGGCTACAGCCAAGGGA ACGTAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC	-8.64	
AS-42	CTCCTCTGACTGTAACCACGTCAATGGG TGATATATGCAGGTTACGCTGGCTAGTT GAAAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC	-6.67	
AS-18	CTCCTCTGACTGTAACCACGCCTGGGAC AGCCACACAGAAGTGTAGACCTCGCGG AATCGGCATAGGTAGTCCAGAAGCC	-9.27	

Масс-спектрометрические исследования показали, что вероятными мишенями для аптамера AS9 являются структурные компоненты цитоскелета филамин А и миозин 9, для AS14 – фибронектин, гелъзолин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы, а для AS42 – молекулярные шапероны, родственные тепловому шоку 71 кДа (Hsp $\alpha$ 8) и HSP 90-бета (Hsp90ab1).

## 2 Исследование чувствительности и специфичности ДНК-аптамеров к асцитным клеткам *in vivo*

Оценку специфичности и чувствительности аптамеров *in vivo* осуществляли с помощью радиофармпрепарата на основе аптамера AS14  $^{11}\text{C}\text{H}_3$ -AS14, синтезированного в центре Ядерной медицины ФМБА России. Исследования показали, что радиофармпрепарат  $^{11}\text{C}\text{H}_3$ -AS14 связывается с асцитными клетками *in vivo* и позволяет определить опухолевые очаги и метастазы в организме мышей. С помощью аптамера AS14 с радиоактивной меткой идентифицированы метастазы в различных органах мыши, таких как легкие, тимус, кишечник, сердце и селезенка, при это показано, что радиофармпрепарат на основе аптамеров был более чувствительным и специфичным, чем 2-дезоксид-2-[фтор-18]фтор-D-глюкоза ( $^{18}\text{F}$ -FDG) – стандартный радиофармпрепарат для диагностики злокачественных опухолей (Рис.2).

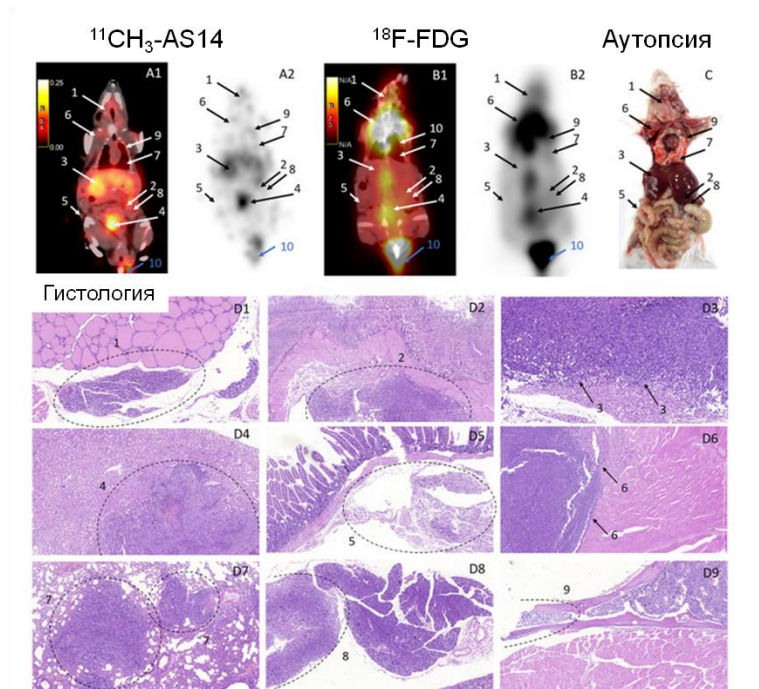


Рисунок 2 – Сравнительная ПЭТ/КТ-визуализация злокачественных опухолей с использованием  $^{11}\text{CH}_3\text{-AS-14}$  и  $^{18}\text{F-FDG}$ .

Вторым методом, подтвердившим чувствительность и специфичность ДНК-аптамеров *in vivo*, стал метод ЯМР-томографии. Результаты исследований показали, что суперпарамагнитные наночастицы Апт-FeАГ накапливаются в солидной опухоли карциномы Эрлиха, клетки которой представляют собой мишень для ДНК-аптамеров (Рис.3).

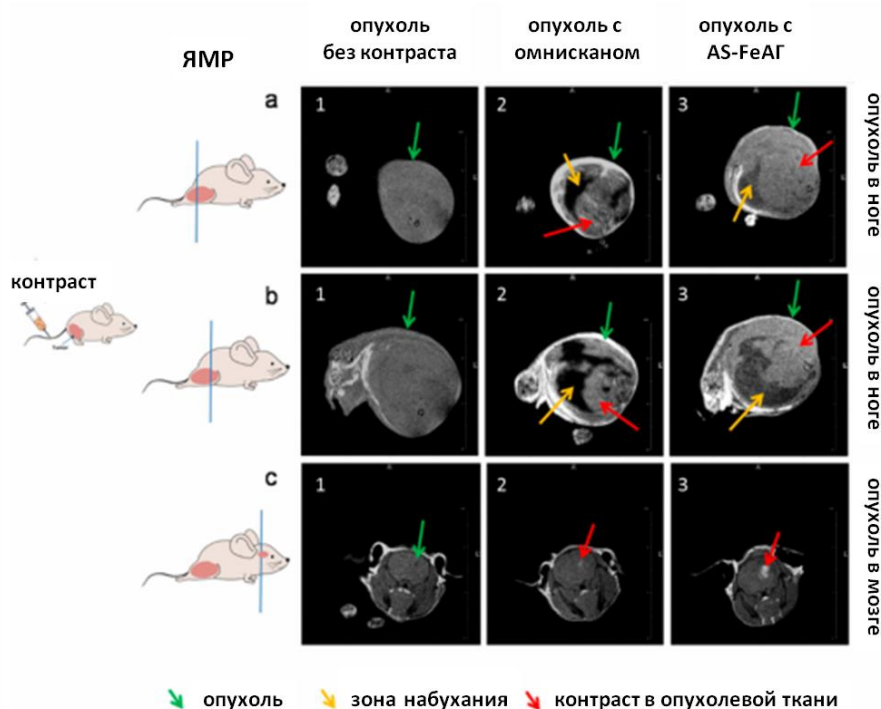


Рисунок 3 – Применение Апт-FeАГ в качестве контрастного вещества для идентификации опухолей при магнитно-резонансной томографии (МРТ).

### **3 Противоопухолевый эффект гипертермии, создаваемый золотыми наночастицами, функционализированными ДНК-аптамерами**

Одним из методов терапии злокачественных новообразований является термотерапия, основанная на более высокой чувствительности опухолевых тканей к повышению температуры. Нагрев опухоли до  $+43,5^{\circ}\text{C}$  вызывает необратимое нарушение конформации белков из-за более высокой кислотности, характерной для опухолевой ткани, в то время как белки нормальных тканей к этой температуре нечувствительны. Применение наночастиц золота, обладающих уникальными оптическими свойствами, позволяет увеличить термосенсибилизацию опухолевых клеток за счет возбуждения плазмонного резонанса. Облучение опухоли, меченной наночастицами, лазером на длине волны, попадающей в полосу плазмонного резонанса наночастиц, увеличивает температуру опухолевых клеток и способствует клеточной гибели.

В наших исследованиях 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 AS42, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью к асцитным клеткам карциномы Эрлиха. Нагревание наночастиц осуществляли путем их облучения видимым лазерным светом с длиной волны 536 нм в течение 5 мин (Рис.4а).

Введение конъюгатов AS42-AuНЧ с последующим лазерным облучением почти полностью устраняло опухоли у мышей, как видно на изображениях ПЭТ/КТ (Рис.4с). У всех мышей при этом развивались большие язвы на участках опухоли (Рис.4б). Гистопатологический анализ показал, что участки опухоли были в основном некротическими с высокой инфильтрацией лейкоцитов. На рис.4д показан противоопухолевый эффект: некроз кожи и подлежащей опухоли, потеря эпидермиса и кровотечение дермы. Мертвые опухолевые клетки имели характерные признаки кариопикноза, кариорексиса и аутолиза. Хотя в центре опухоль выглядела жизнеспособной на гистологических срезах, она была метаболически неактивной.

Таким образом, фототермическое воздействие с помощью наночастиц золота, которые адресно доставлялись к опухолевым клеткам с помощью ДНК-аптамеров AS42, полностью разрушало опухоль, не оказывая никакого воздействия на окружающие опухоль здоровые ткани.

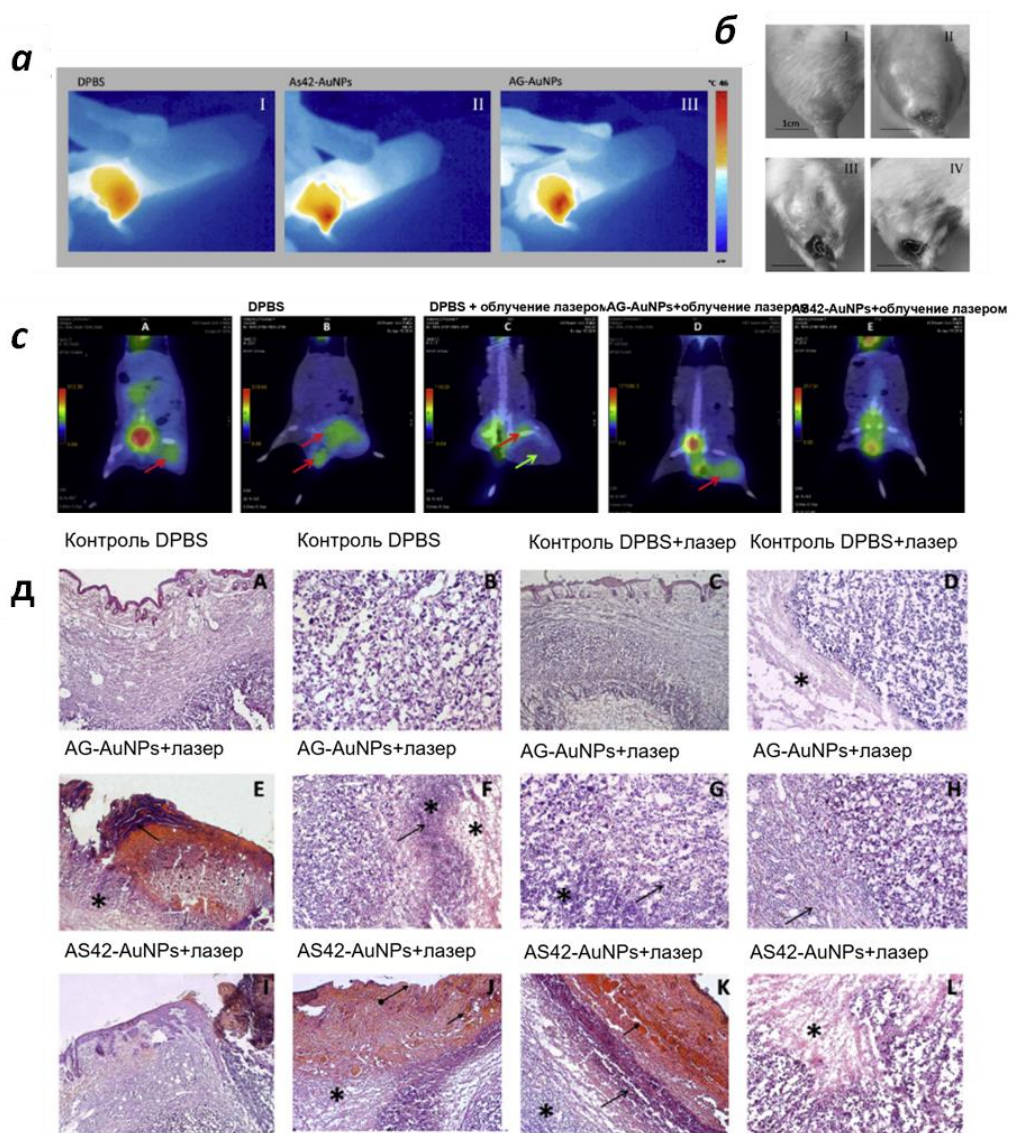


Рисунок 4 – Результаты термотерапии солидной опухоли карциномы Эрлиха с помощью конъюгатов на основе золотых наночастиц.

#### 4 Магнитомеханический метод противоопухолевого воздействия с помощью магнитных наночастиц в переменном магнитном поле

Уникальными инструментами для управления клеткой с помощью механотрансдукции стали магнитные наночастицы, преимуществом которых является дистанционное управление. Магнитная маркировка клеток магнитными наночастицами позволяет ими манипулировать, а также контролировать функции клеток путем приложения внешнего магнитного поля, в том числе осуществлять разрушение опухолевых клеток.

##### *Исследование противоопухолевого эффекта магнитных наночастиц NiTmagoldCit 50nm, покрытых золотом*

Для изучения принципиальных возможностей и оценки перспектив применения магнитных наночастиц, функционализированных ДНК-аптамерами, для нужд магнитомеханической терапии, использовали

сферические суперпарамагнитные наночастицы NITmagoldCit 50nm испанской фирмы Nanoimmunotech.

Противоопухолевую активность этих наночастиц, функционализированных аптамером к асцитным клеткам AS14 (AS14-МНЧ), в переменном магнитном поле *in vivo* оценивали на солидной карциноме Эрлиха. Аптамер AS14 модифицированные МНЧ, свободные МНЧ, аптамер AS14 и фосфатный буфер вводили животным внутривенно. Через 30 минут животных помещали в переменное магнитное поле на 10 минут. Процедуру магнитомеханической деструкции опухолевых клеток повторяли трижды через день, начиная с 5-го дня после трансплантации опухоли. Эффективность магнитомеханической терапии представлена на рис.5.

После терапии AS14-МНЧ в переменном магнитном поле у животных наблюдали ярко выраженный противоопухолевый эффект (Рис.5). Небольшое количество асцитных клеток после воздействия оставалось только на периферии, на больших участках опухоли наблюдался некроз, в опухолевых клетках происходила частичная или полная деструкция с необратимыми изменениями (кариорексис, кариолизис и плазморексис). Воздействие вызвало значительный иммунный ответ, сопровождавшийся воспалительной инфильтрацией сегментированных лейкоцитов на границах некротических участков. Кроме того, выявлены отек и деструктивные изменения микросреды опухолевой ткани (Рис.5).

Для определения механизма противоопухолевого магнитомеханического воздействия с помощью магнитных наночастиц был рассчитан магнитный момент, сила и время действия магнитных частиц в переменном магнитном поле с частотой 50 Гц. Расчеты показали, что в этих условиях функционализированные ДНК-аптамерами магнитные наночастицы заставляют периодически тянуть и расслаблять С-конец фибронектина на 0,07нм за 0,01с. Механическое вытягивание интегрин, активируемое фибронектином, вызывает опосредованный интегрином апоптоз путем индукции каспазного каскада (Рис.6).

### ***Магнитомеханическая противоопухолевая деструкция опухоли с помощью функционализированных ДНК-аптамерами ферроарабиногалактанов в переменном магнитном поле***

Следующим типом суперпарамагнитных наночастиц для подтверждения противоопухолевого эффекта магнитомеханической терапии стали биоразлагаемые магнитные частицы, покрытые арабиногалактаном – ферроарабиногалактаны. В качестве адресного носителя ферроарабиногалактанов для улучшения его накопления в опухоли были использованы аптамеры AS14 и AS42 (Рис.7). Аптамер AS14 связывается с посттрансляционно модифицированным фибронектином внеклеточного матрикса раковых клеток, где треонины ацетилированы в положении 1029 и фосфорилированы в положении 1033. AS42 связывается с белком теплового шока 71 кДа (Hsc70).

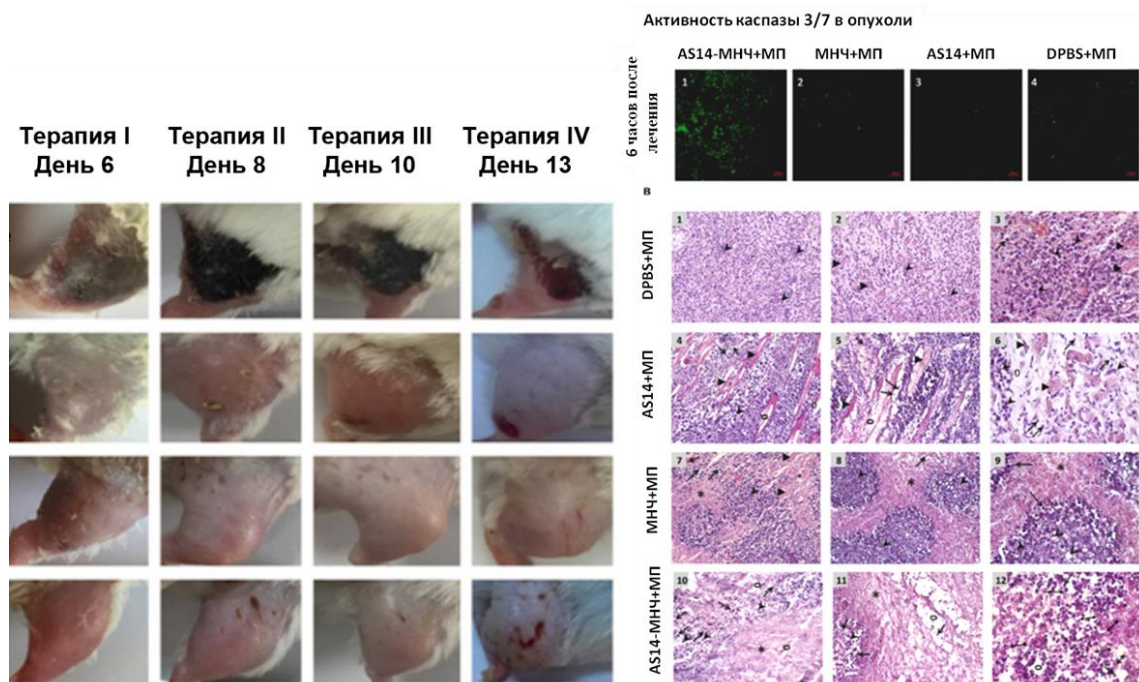


Рисунок 5 – Эффективность магнитомеханической нанотерапии *in vivo* с помощью суперпарамагнитных наночастиц NITmagoldCit 50nm фирмы Nanoimmunotech. Слева – изменение внешнего вида опухоли в процессе терапии; справа – активность каспаз 3/7 в опухолевых клетках через 5 часов после терапии и гистологическая структура опухолей после терапии.

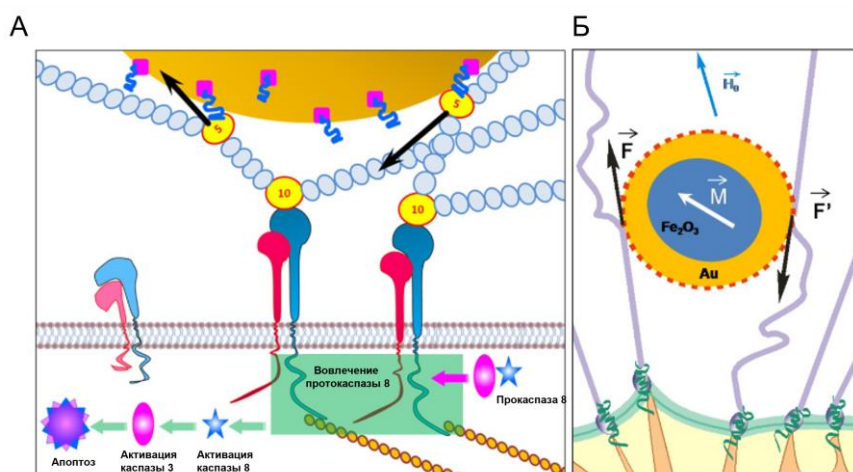


Рисунок 6 – Схема запуска апоптотического каскада каспаз. (А) Каскад вызывается колебаниями фибронектина в низкочастотном переменном магнитном поле, контролируемом AS14-МНЧ, который стимулирует интегрин. (Б) Силы, приложенные к AS14-МНЧ в присутствии низкочастотного переменного магнитного поля, где  $F^{\rightarrow}$  – сила, тянущая фибронектин;  $M^{\rightarrow}$  – магнитный момент МНЧ;  $H^{\rightarrow}$  – внешнее магнитное поле.



Эффективность противоопухолевой магнитомеханической терапии с помощью феррарабиногалактана, функционализированного адресной молекулой – ДНК-аптамером к асцитным клеткам, оценивали на модели асцитной карциномы Эрлиха. Для этого мышам внутривенно вводили Апт-FeAG, FeAG и пул аптамеров AS14 и AS42. Затем через 30 мин после инъекции животных помещали в переменное магнитное поле на 10 мин. Такие процедуры повторяли трижды. Животных, которых не помещали в магнитное поле, использовали в качестве контроля. Результаты исследований показали, что магнитомеханическая противоопухолевая терапия ферроарабиногалактаном, функционализированным ДНК-аптамерами, вызывала воспалительную реакцию в месте опухоли и деградацию опухоли (Рис.7). Гистологические изменения в опухолевых тканях позволили сделать вывод, что нацеливание с помощью аптамеров усиливает противоопухолевые эффекты наночастиц Апт-FeAG. Клетки карциномы Эрлиха в контрольной группе разрушали мышечную ткань. Иммунный ответ отсутствовал (Рис.7). Воздействие пула аптамеров и переменного магнитного поля вызвало воспалительную инфильтрацию сегментированными лейкоцитами. Воздействие FeAG вызвало частичный некроз опухолевых тканей, нарушение клеточной адгезии, воспалительную инфильтрацию сегментированными лейкоцитами и отек (Рис.7).

Арабиногалактан повышает биосовместимость магнитных наночастиц и способствует их интернализации в клетки через рецепторы асиалогликопротеинов (Zamaу T.N., 2014). В отсутствие магнитного поля ориентация магнитных доменов суперпарамагнитных частиц случайна. Внешнее магнитное поле вызывает переориентацию магнитных доменов вдоль поля. Следовательно, низкочастотное (50Гц) переменное магнитное поле вращает суперпарамагнитные частицы Апт-FeAG по часовой стрелке вперед и назад. Связывание частиц через аптамер AS14 с фибронектином и последующая обработка переменным магнитным полем нарушает клеточную адгезию и разрушает раковые клетки. Hsc70, мишень AS42, локализуется в цитоплазме и лизосомах (Majeski A.E., 2004; Xie W., 2015). Нарушение целостности лизосом наночастицами, вращающимися в переменном магнитном поле, может вызвать лизис клеток изнутри (Рис.8).

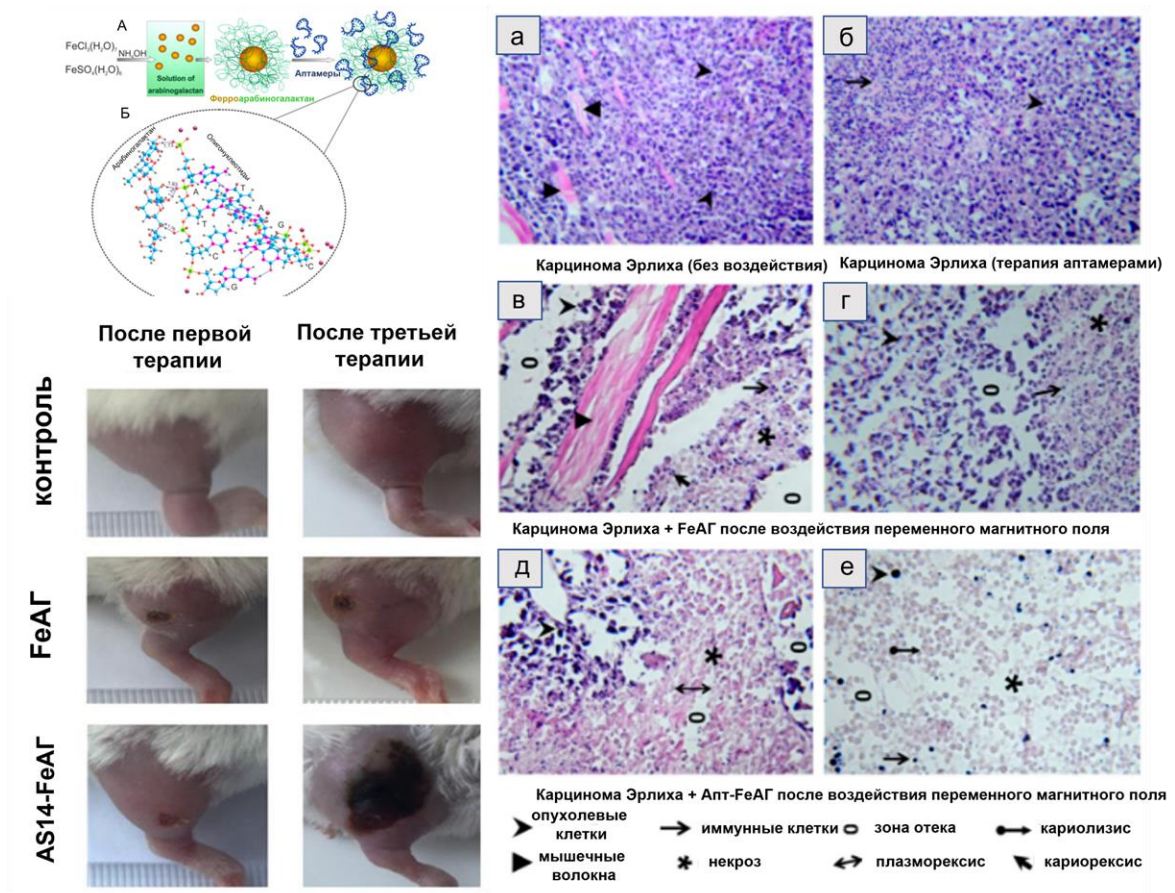


Рисунок 7 – Эффективность магнитомеханической нанотерапии *in vivo* с помощью ферроарабиногалактанов, функционализированных ДНК-аптамерами AS14 и AS42.

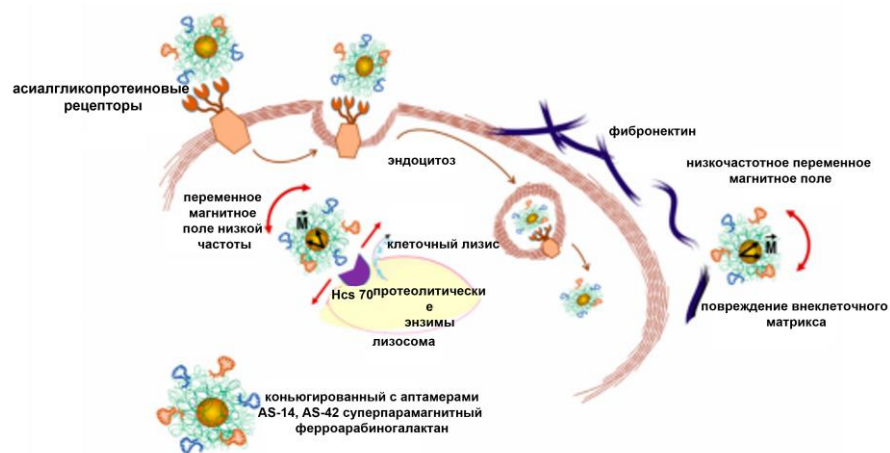


Рисунок 8 – Схема опосредованной асиалогликопротеиновым рецептором доставки и повреждения клеток наночастицами AS-FeAG. МНЧ колеблются в переменном МП. FeAG связывается с фибронектином через AS14 и разрушает внеклеточный матрикс; AS-FeAG в клетке связывается с Hsc70 через аптамер AS42, вызывая повреждение лизосом и утечку протеолитических ферментов, что приводит к лизису клеток.

## **Магнитомеханическая противоопухолевая терапия с помощью функционализированных ДНК-аптамерами трехслойных микродисков (наноскальпеля) в переменном магнитном поле**

Намагниченность трехслойных магнитных микродисков (Au/Ni/Au) размером 600 нм с квазидипольной структурой представлена на рис.9. Оценку противоопухолевого эффекта магнитных микродисков, модифицированных аптамерами, *in vivo* осуществляли на солидной опухоли асцитной карциномы Эрлиха. Для этого в опухоль вводили магнитные диски, модифицированные аптамерами, после чего животных на 10 мин помещали в переменное магнитное поле, что приводило к эффективному разрушению опухолевых клеток (Рис.9). Гистологические исследования показали, что опухолевая ткань мышей контрольной группы имела большое содержание межклеточной жидкости и была окружена деформированной мышечной тканью. Злокачественный процесс приводил формированию многочисленных участков некроза (Рис.9,1А–D). Введение аптамеров вызывало частичное разрушение опухолевых клеток (Рис.9,2А–D). Инъекция магнитных дисков, стабилизированных тиолированными праймерами, не меняла паттерна в гистологических срезах мышей с опухолями (Рис.9,3А–D). Инъекция магнитных дисков, модифицированных AS14 и AS9, не уменьшала количество асцитных клеток в опухолях мышей (Рис.9,4А–D). На гистологических срезах наблюдалась соединительная ткань в состоянии умеренного некроза с опухолевыми инфильтратами и разрушенные опухолевые клетки. В опухолевой ткани у мышей, которым вводили магнитные диски, модифицированные AS14 и AS9, и воздействовали переменным МП, выявлено значительное снижение количества опухолевых клеток (Рис.9,5А–D), что явно указывает на их разрушение.

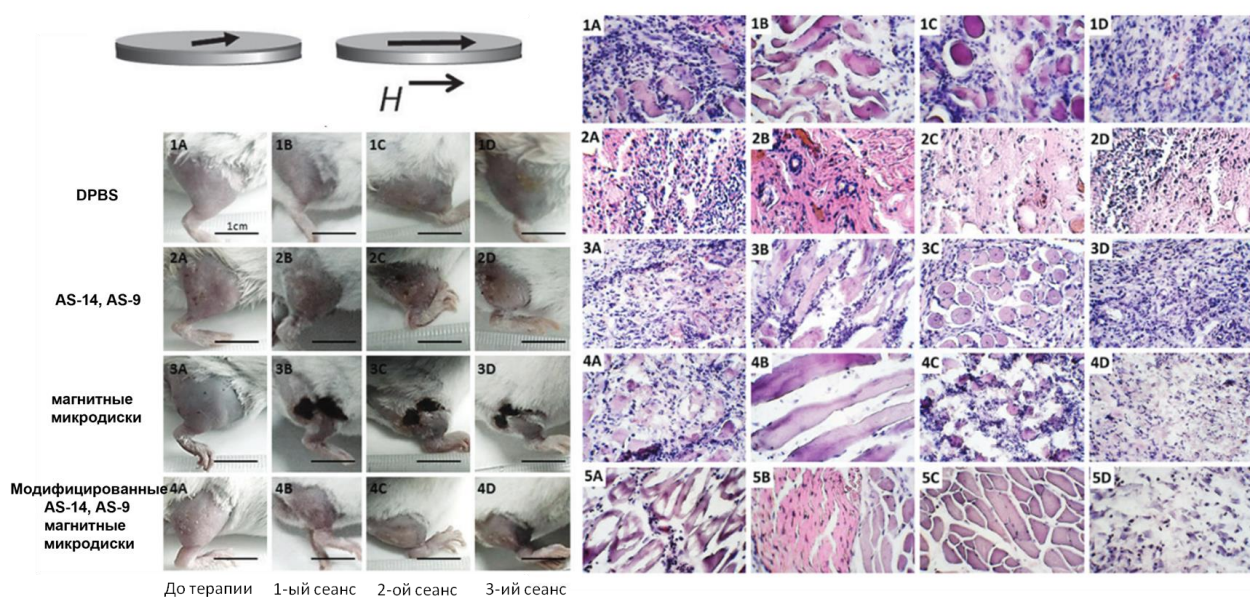


Рисунок 9 – Эффективность магнитомеханической нанотерапии с помощью микродисков, функционализированных ДНК-аптамерами AS14 и AS9, *in vivo*.

## 5 Адресная доставка лекарственных препаратов с помощью ДНК-аптамеров

Повышение эффективности и снижение токсичности традиционных противоопухолевых препаратов – одна из наиболее актуальных проблем онкологии. Лекарства, вводимые традиционными способами, как правило, оказывают системное воздействие, в том числе на непораженные органы, поэтому концентрация препаратов в опухолевых тканях зачастую не достигает терапевтической.

### *Адресная доставка цисплатина с помощью ДНК-аптамеров*

Цисплатин – комплексное соединение двухосновной платины, использующееся в онкологии в качестве эффективного противоопухолевого препарата для лечения различных видов рака (Arnesano F., 2007), применение которого ограничено в силу высокой токсичности, вызывающей нарушения функции почек, анафилактические реакции, лейкопению, тромбоцитопению, анемию и нейропатию (Dasari S., 2014).

Механокомпозит цисплатина с арабиногалактаном (Рис.10), адресно доставляемый к опухолевым клеткам, существенно снизил токсичность цисплатина без потери его противоопухолевой эффективности (Рис.10). Морфологические исследования показали, что под влиянием как цисплатина, так и его конъюгатов опухолевые клетки погибали путем некроза и апоптоза (Рис.11).

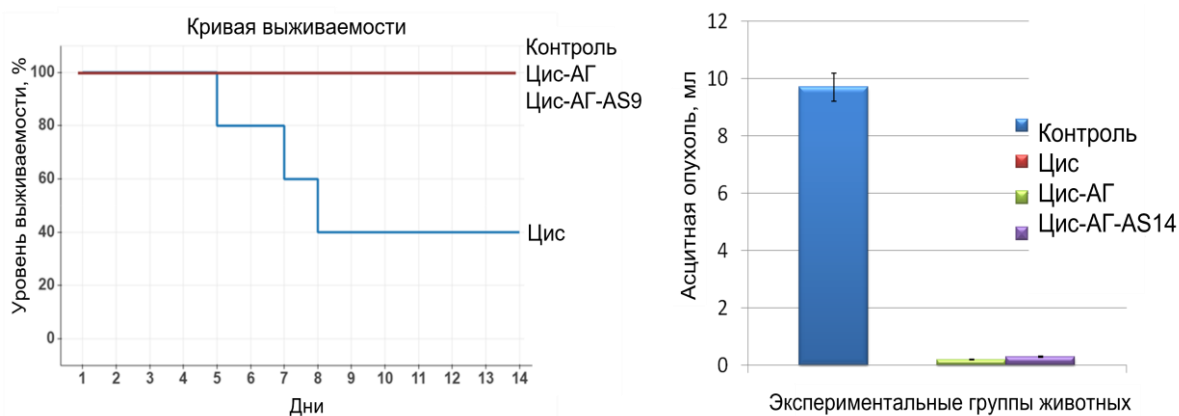


Рисунок 10 – Результаты адресной противоопухолевой терапии *in vivo* цисплатином и его конъюгатами. Слева – кривая выживаемости мышей. Справа – объем асцитной опухоли.

### *Адресная доставка циклофосфамида и его конъюгатов с помощью аптамеров*

К широко применяемым при злокачественных новообразованиях химиотерапевтическим препаратам относится циклофосфамид (ЦФА) (2-оксо-2-ди (β-хлорэтил) аминотетрагидро-2,1,3-фосфоксазин). Этот алкилирующий цитостатик является производным бис-(β-хлорэтил)-амина и

обладает широким спектром противоопухолевой активности, однако применение циклофосфида ограничивается из-за широкого спектра его побочных эффектов, в том числе иммунодепрессивного (Voelcker G., 2020), что делает актуальным разработку систем направленного транспорта этого препарата.

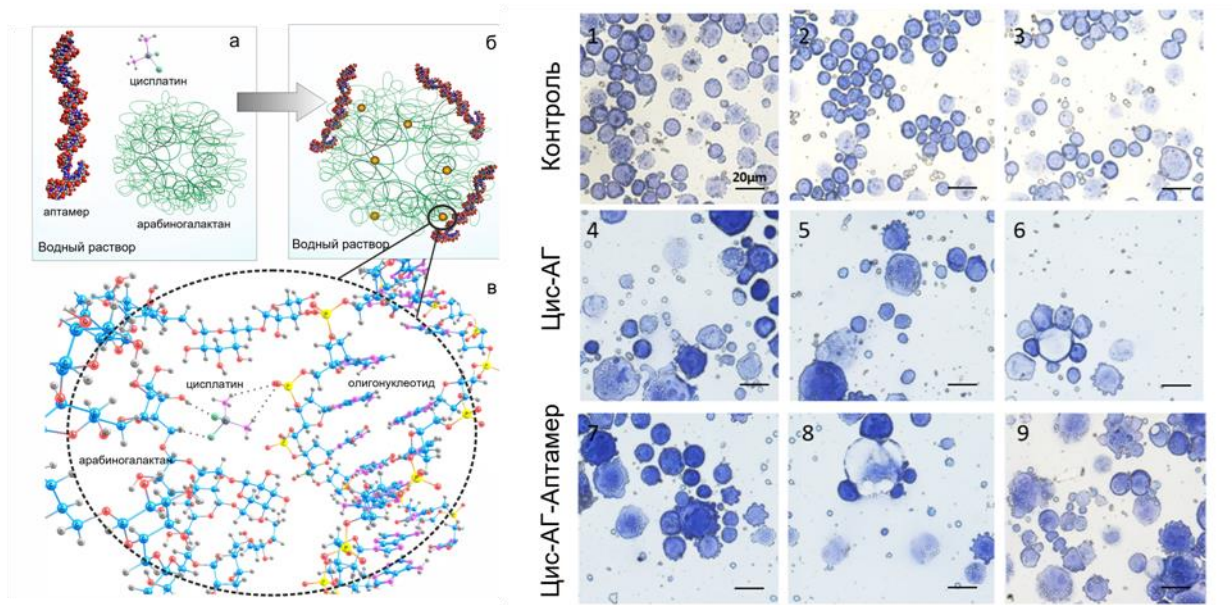


Рисунок 11 – Структура механокомпозиата цисплатина с арабиногалактаном, модифицированного нацеливающими на асцитную опухоль аптамерами (слева), и морфология асцитных клеток, выделенных из брюшной полости мышей, при воздействии конъюгатами цисплатина.

В работе оценивалась противоопухолевая активность механокомпозиата ЦФА с АГ, функционализированного аптамером к асцитным клеткам карциномы Эрлиха AS42. Адресная доставка к опухоли с помощью ДНК-аптамеров стандартного противоопухолевого препарата циклофосфида, в комплексе с арабиногалактаном, увеличивала продолжительность жизни животных почти в 3 раза по сравнению с животными, проходившими терапию стандартным препаратом циклофосфида (Рис.12). Гистологическое исследование показали, что все противоопухолевые препараты на основе ЦФА проявляли цитотоксический эффект, несмотря на то, что в конъюгатах с АГ действующего вещества – ЦФА было всего 10% (Рис.12).

Таким образом, в целом адресная доставка противоопухолевых препаратов конъюгатов циклофосфида и цисплатина с арабиногалактаном ДНК-аптамерами позволила увеличить эффективность терапии и снизить ее токсичность.

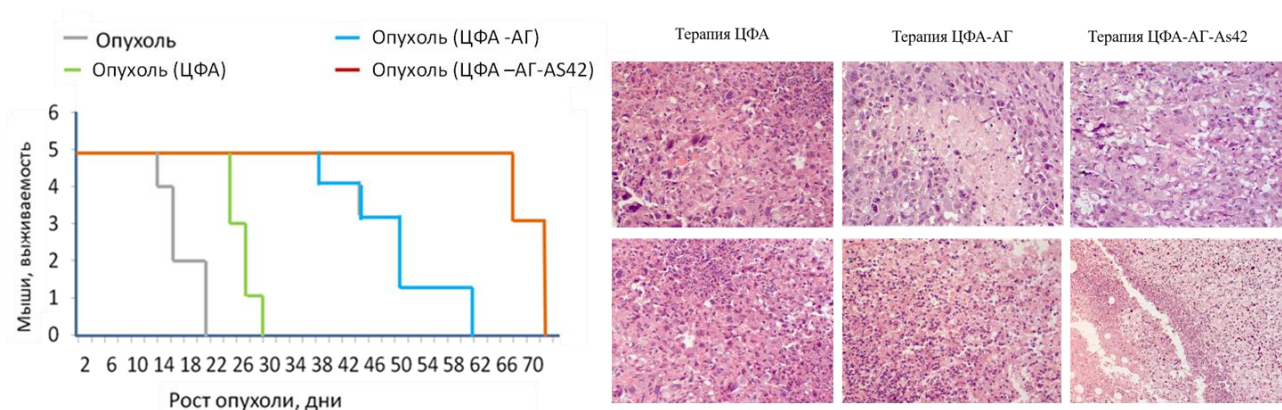


Рисунок 12 – Эффективность адресной противоопухолевой терапии с помощью конъюгата ЦФА с арабиногалактаном.

## 6 Биобезопасность молекулярных конструкций на основе ДНК-аптамеров для адресного противоопухолевого воздействия

Оценку токсичности молекулярных конструкций на основе ДНК-аптамеров оценивали путем определения стандартных биохимических параметров сыворотки крови, таких как холестерин, сывороточная аланин-аминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), билирубин и общий белок. АЛТ участвует в энергетическом метаболизме в печени, общий билирубин является маркером гепатобилиарного поражения и гемолиза, а ЩФ указывает на повреждение гепатоцитов. Общий белок плазмы, основная масса которого состоит из альбумина, синтезирующегося в печени, характеризует обмен белков в организме в целом. Отклонение уровня общего белка от нормы может являться симптомом различных заболеваний. Холестерин – липид, имеющий ключевое значение для нормального функционирования организма, 80% которого образуется в печени. При снижении синтеза холестерина может развиваться угнетение ряда физиологических процессов. Результаты определения некоторых стандартных показателей сыворотки крови представлены в таблице 2.

Результаты исследований, представленные в таблице, не выявили существенных отличий в биохимических параметрах сыворотки крови у мышей при введении им молекулярных конструкций на основе ДНК-аптамеров и контрольных животных. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что молекулярные конструкции на основе ДНК-аптамеров (FeAG-AS9, <sup>11</sup>CH<sub>3</sub>-AS14, AuHЧ-AS9, NiTmagoldCit50nm-AS14, Au-Ni-Au-AS42, AS9-AS14, АГ-Cis-AS42, АГ-ЦФА-AS42) не вызывают патологических изменений у мышей, следовательно, являются биобезопасными и биосовместимыми.

Таблица 2. Некоторые биохимические параметры сыворотки крови мышей (самки и самцы) при введении им молекулярных конструкций на основе ДНК-аптамеров.

№	Группы мышей	Холестерол, мМ	Общий белок, г/л	АЛТ, отн.ед./л	ЩФ, отн.ед./л	Общий билирубин, мкМ
1	<b><i>AuHЧ-AS42</i></b>					
	Самцы (n=4)	1,70±0,01	49,8±3,3	22,4±3,7	299,5±84,8	5,9±0,4
	Самцы (n=5)	1,76±0,48	49,0±6,2	22,9±13,2	280,9±32,3	6,0±0,2
	<b><i>Контроль</i></b>					
	Самцы (n=5)	2,30±0,20	55,7±2,3	17,5±4,8	202,9±27,1	6,3±0,6
2	<b><i>MHЧ-AS14</i></b>					
	Самцы (n=5)	1,45±0,01	50,8±3,3	18,4±3,7	214,5±74,8	5,5±0,4
	Самцы (n=5)	1,56±0,48	54,0±6,2	31,9±13,7	254,9±22,3	6,1±0,2
	<b><i>Контроль</i></b>					
	Самцы (n=5)	2,90±0,20	53,9±1,3	13,5±4,8	177,7±27,1	6,3±0,7
3	<b><i>Au/Ni/Au-AS14</i></b>					
	Самцы (n=4)	1,5±0,02	54,7±3,2	26,4±3,7	240,7±65,9	5,8±0,5
	Самцы (n=5)	1,6±0,08	54,0±6,6	27,9±10,2	239,8±20,6	5,9±0,5
	<b><i>Контроль</i></b>					
	Самцы (n=5)	2,90±0,2	53,9±1,2	13,5±4,8	177,7±27,1	6,3±0,7
4	<b><i>Цис-АГ-AS14</i></b>					
	Самцы (n=10)	3,0±0,26	-	0,41±0,10	140,5±20,1	1,7±0,3
	<b><i>Контроль</i></b>					
5	<b><i>ЦФА-АГ-AS42</i></b>					
	Самцы (n=10)	1,6±0,4	-	110,0±15,1	90,0±12,0	49,5±6,2
	<b><i>Контроль</i></b>					
6	<b><i><sup>113</sup>CН<sub>3</sub>-AS14</i></b>					
	Самцы (n=10)	-	64,6±10,0	62,6±7,2	280,9±12,9	6,2±1,2
	<b><i>Контроль</i></b>					
6	<b><i>Контроль</i></b>					
	Самцы (n=10)	-	62,7±6,2	69,8±6,2	220,6±22,8	6,2±1,2

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения работы получены нетоксичные биосовместимых бионаноконструкции, нацеленные на опухолевую ткань, позволяющие: (1) увеличить эффективность и снизить токсичность стандартных препаратов противоопухолевой химиотерапии путем их адресной доставки к опухолевым очагам; (2) осуществить адресную деструкцию опухоли с помощью золотых наночастиц, нацеленных на опухоль, путем гипертермии, вызванной плазмонным резонансом золотых наночастиц; (3) осуществить адресную деструкцию опухоли методом магнитомеханической терапии в низкочастотном переменном магнитном

поле с помощью суперпарамагнитных наночастиц, покрытых арабиногалактаном и золотом; (4) осуществить адресное разрушение опухоли методом магнитомеханической терапии в низкочастотном переменном магнитном поле с помощью магнитных трехслойных (Au/Ni/Au) дисков с квазидипольной структурой (наноскальпеля). Разработанную методологию адресной нанотерапии можно использовать для терапии других онкологических заболеваний (Рис.13).

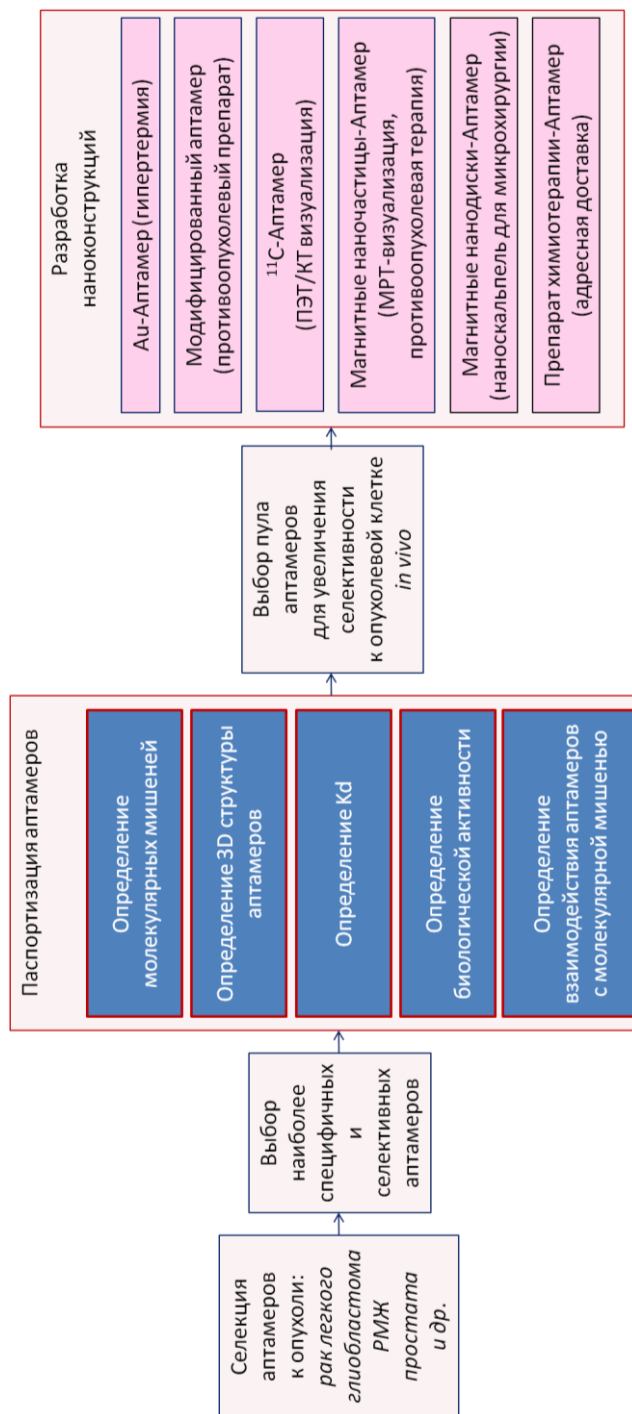


Рисунок 13 – Методология создания наноконструкций на основе ДНК-аптамеров для адресной диагностики и лечения онкологических заболеваний.



## ВЫВОДЫ

1. В результате селекции получены ДНК-аптамеры, высокочувствительные и высокоселективные асцитным клеткам карциномы Эрлиха с константами диссоциации в наномолярном диапазоне. Константа диссоциации (Kd) аптамера AS9 составила 1.25 нМ, константа диссоциации (Kd) аптамера AS42 – 3.91 нМ.

2. Аптамеры к асцитным клеткам, связывающиеся с разными молекулярными мишенями вызывают различные биологические эффекты. Аптамер AS42 уменьшает долю клеток с транслокацией фосфатидилсерина, предотвращая апоптоз клеток. Аптамеры AS14 и AS18 увеличивают долю клеток с транслокацией фосфатидилсерина, что свидетельствует о стимуляции ими апоптоза. Аптамер AS9 увеличивает уровень апоптоза и полностью подавляет клеточное деление.

3. ДНК-аптамеры адресно связываются со своими молекулярными мишенями *in vivo*, что подтверждается стандартными методами, используемыми в медицине, а именно, ПЭТ-КТ с использованием радиофармпрепарата на основе ДНК-аптамера 11СН3-AS14 и МРТ с использованием функционализированных ДНК-аптамерами суперпарамагнитных наночастиц, покрытых арабиногалактаном (ферроарабиногалактанов).

4. Плазмонный резонанс функционализированных ДНК-аптамерами золотых наночастиц (Au-AS42), индуцированный лазером на длине волны, попадающей в полосу плазмонного резонанса наночастиц, вызывает гипертермию опухолевой ткани и ее разрушение *in vivo* путем некроза, не оказывая разрушительного воздействия на окружающие опухоль здоровые ткани.

5. Дистанционное управление магнитными наночастицами NiTmagoldCit 50nm и покрытыми арабиногалактаном суперпарамагнитными наночастицами (ферроарабиногалактанми), функционализированными ДНК-аптамерами, с помощью низкочастотного переменного магнитного поля, вызывает адресное магнитомеханическое разрушение опухолевой ткани путем апоптоза асцитных клеток, что подтверждается активацией в них каспаз.

6. Наноразмерный комплекс, состоящий из магнитных нанодисков (Au/Ni/Au) и ДНК-аптамеров, способен адресно связываться с белками клеточных мембран опухолевых клеток и под влиянием низкочастотного переменного магнитного поля осуществлять деструкцию опухолевых клеток.

7. Адресная доставка к опухоли с помощью ДНК-аптамеров стандартного противоопухолевого препарата циклофосфида в комплексе с арабиногалактаном снижает токсичность и улучшает эффективность циклофосфида, что увеличивает продолжительность жизни животных

почти в 3 раза по сравнению с животными, проходившими терапию стандартным циклофосфамидом.

8. Цисплатин в комплексе с арабиногалактаном, адресно доставляемый к опухоли ДНК-аптамерами, практически полностью подавляет рост опухоли в дозе в 20 раз меньшей по сравнению со стандартным высокотоксичным препаратом цисплатина.

9. Целевые противоопухолевые бионаноконструкции на основе молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров для диагностики и терапии асцитной карциномы Эрлиха – 11СН3-AS14, AuНЧ, магнитные наночастицы, магнитные диски и конъюгаты стандартных препаратов химиотерапии нетоксичны и биобезопасны.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Коловская О.С.**, Замай Т.Н., Замай А.С., Глазырин Ю.Е., Спивак Е.А., Зубкова О.А., Кадкина А.В., Еркаев Е.Н., Замай Г.С., Савицкая А.Г., Труфанова Л.В., Петрова Л.Л., Березовский М.В. Взаимодействие ДНК-аптамер/белок как причина апоптоза и остановки пролиферации в клетках асцитной карциномы Эрлиха // Биологические мембраны= Biologisches Membranu. – 2013. – Т.30, №5-6. – С.398-411.

2. 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.A., Sheina Y.A., Salmina A.B., Berezovski M.V., Zamay A.S. DNA-aptamer targeting vimentin for tumor therapy in vivo // Nucleic Acid Therapeutics. – 2013. – Vol.23, №6. – P.1-17.

3. Ким П.Д., Замай С.С., Замай Т.Н., Прокопенко В.С., **Коловская О.С.**, Замай Г.С., Принц В.Я., Селезнев В.А., Комонов А.И., Спивак Е.А., Руденко Р.Ю., Дубынина А.В., Комаров А.В., Денисенко В.В., Комарова М.А., Соколов А.Э., Народов А.А., Живаев В.П., Замай А.С. Противоопухолевый эффект конъюгатов магнитных нанодисков с ДНК-аптамерами // Доклады Академии наук = Doklady Biological Sciences. – 2015. – Т.466, №5. – С.1-4.

4. Старков А.К., Замай Т.Н., Савченко А.А., Инжеваткин Е.В., Титова Н.М., **Коловская О.С.**, Лузан Н.А., Силкин П.П., Кузнецова С.А. Противоопухолевый эффект комплекса арабиногалактана с платиной // Доклады Академии наук = Doklady Biological Sciences. – 2016. – Т.467, №1. – С.112-114.

5. Zamay T.N., Zamay G.S., Belyanina I.V., Zamay S.S., Denisenko V.V., **Kolovskaya O.S.**, Ivanchenko T.I., Grigorieva V.L., Garanzha I.V., Veprintsev D.V., Glazyrin Y.E., Shabanov A.V., Prinz V.Y., Seleznev V.A., Sokolov A.E., Prokopenko V.S., Kim P.D., Gargaun A.B., Berezovski M.V., Zamay A.S.

Noninvasive Microsurgery Using Aptamer-Functionalized Magnetic Microdiscs for Tumor Cell Eradication // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2017. – Vol.27, №2. – P. 105-114.

6. Белянина И.В., Замай С.С., **Коловская О.С.**, Замай Г.С., Гаранжа И.В., Григорьева В.Л., Глазырин Ю.Е., Замай Т.Н., Кичкайло А.С. Адресная противоопухолевая терапия с использованием биоконъюгатов магнитных наночастиц с ДНК-аптамерами // *Сибирское медицинское обозрение = Siberian Medical Review*. – 2016. – №5. – С.77-79.

7. Дубынина А.В., Замай Т.Н., **Коловская О.С.**, Кичкайло А.С., Белянина И.В., Чанчикова Н.Г., Токарев Н.А., Карлова Е.А., Александровский А.С., Шепелевич Н.В., Озерская А.В., Бадрин Е.А., Белугин К.В., Белкин С.А. Адресная деструкция злокачественных опухолей биоконъюгатами на основе аптамеров // *Сибирское медицинское обозрение = Siberian Medical Review*. – 2016. – №5. – С.88-90.

8. Belyanina I.V., **Kolovskaya O.S.**, Zamay S.S., Gargaun A.B., Zamay T.N., Kichkaylo A.S. Targeted magnetic nanotheranostics of cancer // *Molecules*. – 2017. – Vol.22, №6. – P.975-994.

9. Belyanina I.V., Zamay T.N., Zamay G.S., Zamay S.S., **Kolovskaya O.S.**, Ivanchenko T.I., Denisenko V.V., Kirichenko A.K., Glazyrin Y.E., Garanzha I.V., Grigorieva V.V., Shabanov A.V., Veprintsev D.V., Sokolov A.E., Sadovskii V.M., Gargaun A.B., Berezovski M.V., Kichkaylo A.S. In vivo cancer cells elimination guided by aptamer-functionalized gold-coated magnetic nanoparticles and controlled with low frequency alternating magnetic field // *Theranostics*. – 2017. – Vol.13, №7. – P.3326-3337.

10. **Kolovskaya O.S.**, Zamay T.N., Belyanina I.V., Karlova E., Garanzha I., Aleksandrovsky A.S., Kirichenko A.K., Dybinina A.V., Sokolov A.E., Zamay G.S., Glazyrin Y.E., Zamay S., Ivanchenko T., Chanchikova N., Tokarev N., Shepelevich N., Ozerskaya A., Badrin E., Belugin K., Belkin S., Zablude V., Gargaun A., Berezovski M.V., Kichkaylo A.S. Aptamer-Targeted Plasmonic Photothermal Therapy of Cancer // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. – 2017. – №9. – P.12-21.

11. **Коловская О.С.**, Замай Т.Н., Замай Г.С., Глазырин Ю.Е., Крат А.В., Народов А.А., Замай С.С., Кичкайло А.С. Цифровые лекарства на основе аптамеров для диагностики и терапии социально-значимых заболеваний // *Сибирское медицинское обозрение = Siberian Medical Review*. – 2018. – Т.109, №1. – С.5-14.

12. **Kolovskaya O.S.**, Zamay G.S., Babkin V.A., Narodov A.A., Zamay T.N., Morozov E.E., Lapin I.N., Kichkaylo A.S. Aptamer conjugated superparamagnetic ferroarabinogalactans for cancer therapy // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. – 2019. – Vol.17, №1. – P.22-23.

13. Stolyar S.V., Chekanova L.A., Yaroslavtsev R.N., Komogortsev S.V., Gerasimova Yu.V., Bayukov O.A., Olochaev M.N., Ishakov R.S., Garanzha I.V., **Kolovskaya O.S.**, Bairmani M.Sh., Zamay T.N. Magnetic nanoconstructions of iron oxides coated with arabinogalactan functionalized with DNA aptamer // Journal of Physics: Conference Series. – 2019. – №1399. – 022026.

14. Замай Т.Н., Старков А.К., **Коловская О.С.**, Кичкайло А.С., Инжеваткин Е.В., Замай Г.С., Титова Н.М., Замай С.С., Пац Ю.И. Снижение токсичности цисплатина путем его конъюгации с арабиногалактаном // Биологические мембраны= Biologicheskie Membrany. – 2020. – Т.37, №1. – С.69-75.

15. **Kolovskaya O.S.**, Zamay T.N., Zamay G.S., Babkin V.A., Medvedeva E.N., Neverova N.A., Kirichenko A.K., Zamay S.S., Lapin I.N., Morozov E.V., Sokolov A.E., Narodov A.A., Fedorov D.G., Tomilin F.N., Zabluda V.N., Alekhina Y.A., Lukyanenko K.A., Glazyrin Y.E., Svetlichnyi V.A., Berezovski M.V., Kichkailo A.S. Aptamer-Conjugated Superparamagnetic Ferroarabinogalactan Nanoparticles for Targeted Magnetodynamic Therapy of Cancer // Cancers. – 2020. – Vol.12, №216. – P.1-17.

16. Zamay T.N., Zamay S.S., **Kolovskaya O.S.**, Kichkailo A.S. Magnetic Nanoparticles in Theranostics // Handbook of Materials for Nanomedicine: Metal-Based and Other Nanomaterials. – Danvers, Jenny Stanford of Publishing Ptc. Ltd. – 2020. – P.201-244.

17. Zamay T.N., Prokopenko V.S., Zamay S.S., Lukyanenko K.A., **Kolovskaya O.S.**, Orlov V.A., Zamay G.S., Galeev R.G., Narodov A.A., Kichkailo A.S. Magnetic nanodiscs - a new promising tool for microsurgery of malignant neoplasms // Nanomaterials. – 2021. – Vol.11, №6. – P.1459-1474.

18. Ozerskaya A.V., Zamay T.N., **Kolovskaya O.S.**, Tokarev N.A., Belugin K.V., Chanchikova N.G., Badmaev O.N., Zamay G.S., Shchugoreva I.A., Moryachkov R.V., Zabluda V.N., Khorzhevskii V.A., Shepelevich N.V., Gappoev S.V., Karlova E.A., Saveleva A.S., Volzhentsev A.A., Blagodatova A.N., Lukyanenko K.A., Veprintsev D.V., Smolyarova T.E., Tomilin F.N., Zamay S.S., Silnikov V.N., Berezovski M.V., Kichkailo A.S. 11C-Radiolabeled Aptamer for Imaging of Tumor and Metastasis Using Positron Emission Tomography - Computed Tomography // Molecular Therapy - Nucleic Acids. – 2021. – Vol.26. – P.1159-1172.

19. Zamay T.N., Starkov A.K., **Kolovskaya O.S.**, Zamay G.S., Veprintsev D.V., Luzan N., Nikolaeva E.D., Lukyanenko K.A., Artyushenko P.V., Shchugoreva I.A., Glazyrin Y.E., Koshmanova A.A., Krat A.V., Tereshina D.S., Zamay S.S., Pats Y.S., Zukov R.A., Tomilin F.N., Berezovski M.V., Kichkailo A.S. Nucleic Acid Aptamers Increase the Anticancer Efficiency and Reduce the Toxicity of Cisplatin-Arabinogalactan Conjugates In Vivo. Nucleic Acid Ther. – 2022. – Aug 3. doi: 10.1089/nat.2022.0024.

**ПАТЕНТ**

**Коловская О.С.,** Замай Г.С., Замай Т.Н., Замай А.С., Салмина А.Б., Крат А.В., Бельтюков В.К., Попов Д.В., Модестов А.А. Аптамер, специфичный к опухолевой ткани легкого человека // №2528870, приоритет от 06 ноября 2012, зарегистрирован 25 июля 2014.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность нашему творческому коллективу, без постоянной помощи и поддержки которых, плодотворного обсуждения идей, планов экспериментов и полученных результатов эта работа не могла бы состояться. Выражаю свою искреннюю благодарность Марии Трусовой, Анастасии Кошмановой, Галине Замай, Щугоревой Ирине, Вепринцеву Дмитрию, Артюшенко Полине, Юрию Глазырину, Томилину Феликсу, Белугину Кириллу, Озерской Анастасии, Морозову Евгению, Алексею Соколову за помощь в проведении экспериментов, анализе данных, плодотворные обсуждения результатов, вдохновение и повсеместную поддержку. Особой благодарностью хотелось бы отметить Зукова Руслана Александровича, Максима Валентиновича Березовского, Татьяну Николаевну Замай, Анну Сергеевну Кичкайло, Хоржевского Владимира Алексеевича и Кириченко Андрея Константиновича, без постоянной помощи и поддержки которых, обсуждения идей, планов экспериментов, полученных результатов, конструктивной критики, и добрых слов эта работа не могла бы состояться. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (16-42-240662), Российского научного фонда (14-15-00805).