

© ЗАМАЙ С. С., ПРОКОПЕНКО В. С., ЛУКЪЯНЕНКО К. А., СОКОЛОВ А. Э.

УДК 537.624.9

DOI: 10.20333/2500136-2021-2-79-82

Наноскальпель на основе магнитных дисков и аптамеров эффективно и адресно разрушает опухолевые ткани

С. С. Замай¹, В. С. Прокопенко², К. А. Лукьяненко¹, А. Э. Соколов¹

¹Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» СО РАН, Красноярск 660036, Российская Федерация

²Красноярский государственный педагогический университет им. В. П. Астафьева, Красноярск 660049, Российская Федерация

Цель исследования. Исследовать противоопухолевую эффективность трехслойных магнитных нанодисков (Au/Ni/Au) с квазидипольной структурой, функционализированных биораспознающими опухоль молекулами.

Материал и методы. Трехслойные магнитные нанодиски (Au/Ni/Au) размером 500 нм были получены по технологиям микро- и наноэлектроники. Для функционализации магнитных нанодисков были использованы аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха. Для связывания дисков с аптамерами использовали тиоловые группы. В качестве модели опухолевых клеток использовали асцитные клетки карциномы Эрлиха. Магнитомеханическое воздействие на клетки оказывали с помощью переменного магнитного поля (50 Гц, 100 Э).

Результаты. Магнитные нанодиски обладают магнитной анизотропией, что доказывает их высокую чувствительность к магнитным раздражителям. Магнитные нанодиски запускают в течение двух часов в культуре асцитных клеток процессы клеточной гибели. Предположительно магнитные нанодиски с помощью аптамеров связываются с белком клеточной мембраны филламином А – структурным компонентом цитоскелета, играющим важную роль в клеточной сигнализации, и при воздействии переменного магнитного поля вызывают разрушение клеточной мембраны и гибель клеток.

Заключение. Микрохирургия злокачественных опухолей с помощью наноскальпеля на основе функционализированных распознающими опухолевые сайты лигандов может быть использована для удаления одиночных опухолевых клеток во время оперативного вмешательства.

Ключевые слова: аптамеры, магнитные нанодиски, переменное магнитное поле, опухолевые клетки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Замай СС, Прокопенко ВС, Лукьяненко КА, Соколов А Э. Наноскальпель на основе магнитных дисков и аптамеров эффективно и адресно разрушает опухолевые ткани. *Сибирское медицинское обозрение.* 2021;(2):79-82. DOI: 10.20333/2500136-2021-2-79-82

Nanoscalpel based on magnetic discs and aptamers effectively and targeted destroy tumor cell

S. S. Zamay¹, V. S. Prokopenko², K. A. Lukyanenko¹, A. E. Sokolov²

¹Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation

²V. P. Astafiev Krasnoyarsk State Pedagogical University, Krasnoyarsk 660049, Russian Federation

The aim of the research. To investigate the antitumor efficacy of three-layer magnetic nanodiscs (Au / Ni / Au) with a quasi-dipole structure, functionalized with biorecognizing molecules of a tumor.

Material and methods. Three-layer magnetic nanodiscs (Au / Ni / Au) 500 nm in size (were obtained by micro- and nanoelectronic technologies. Aptamers to ascites cells of Ehrlich carcinoma were used to functionalize magnetic nanodiscs. Thiol groups were used to bind disks to aptamers. As a model of tumor cells Ehrlich's ascites carcinoma cells were used, and the cells were magnetically influenced by an alternating magnetic field (50 Hz, 100 Oe).

Results. Magnetic nanodiscs have magnetic anisotropy, which proves their high sensitivity to magnetic stimuli. Magnetic nanodiscs start the processes of cell death in the culture of ascites cells for two hours. Presumably, magnetic nanodiscs use aptamers to bind to the cell membrane protein filamin A, a structural component of the cytoskeleton that plays an important role in cell signaling and, when exposed to a variable magnetic, cause destruction of the cell membrane and cell death.

Conclusion. Microsurgery of malignant tumors using a nanoscalpel based on functionalized ligands that recognize tumor sites can be used to remove single tumor cells during surgery.

Key words: aptamers, magnetic nanodiscs, alternating magnetic field, tumor cells.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Zamay SS, Prokopenko VS, Lukyanenko KA, Sokolov AE. Nanoscalpel based on magnetic discs and aptamers effectively and targeted destroy tumor cell. *Siberian Medical Review.* 2021; (2):79-82. DOI: 10.20333/2500136-2021-2-79-82

Введение

Злокачественные новообразования до настоящего времени остаются одной из лидирующих причин смертности трудоспособного населения. Ведущими методами терапии злокачественных новообразований остаются хирургия и лучевая терапия. Основным

недостатком этих методов является их высокая инвазивность, поскольку использование этих методов повреждает окружающие опухоль здоровые ткани, что особенно опасно при терапии глиальных опухолей головного мозга. Другим недостатком этих методов является невозможность радикального удаления всех

опухолевых клеток, поскольку одиночные опухолевые клетки незаметны и впоследствии могут стать очагом формирования новой опухоли. Следовательно, для максимально радикального удаления опухоли с минимальным повреждением здоровой ткани должен быть предложен инструмент, способный находить и адресно удалять только опухолевые клетки, не повреждая при этом здоровые ткани.

Создание такого инструмента возможно только с помощью нанотехнологий, использующих наноматериалы с уникальными электронными, оптическими и магнитными свойствами. Наноразмерный хирургический инструмент для удаления/разрушения опухоли (наноскальпель) должен включать в себя, как минимум, два компонента. Первый компонент (собственно сам наноскальпель) должен обладать способностью под влиянием внешних сил повреждать опухолевую клетку, индуцируя процессы ее гибели. Второй компонент должен выполнять функцию распознающего элемента и взаимодействовать только с опухолью, осуществляя, таким образом, контакт наноскальпеля с опухолевой клеткой.

В последнее время наибольшей популярностью пользуются суперпарамагнитные наночастицы, которые проявляют магнитные свойства только при наложении магнитного поля. Однако эффективность таких наночастиц осуществлять деструкцию опухолевых клеток достигла своего предела [1]. Это связано, прежде всего, с тем, что величина магнитного отклика суперпарамагнитных наночастиц, необходимая для биомедицинских применений, ограничена их размерами, так как выше суперпарамагнитного предела наночастицы агрегируют. Поэтому сейчас все активнее стали применять магнитные частицы с магнитной анизотропией.

Для деструкции опухолевых клеток к настоящему времени было использовано 4 типа магнитных антизотропных дисков – синтетические антиферромагнитные SAF и P-SAF [2], вихревые Py [3] и трехслойные системы немагнетик/ферромагнетик/немагнетик, где в качестве ферромагнитной начинки использован никель по причине его ярко выраженных магнито-стрикционных свойств в сочетании с небольшой константой кристалло-графической анизотропии [4].

Целью работы стало исследование противоопухолевой эффективности трехслойных магнитных дисков (Au/Ni/Au) с квазидипольной структурой, функционализированных биораспознающими опухоль молекулами.

Материал и методы

Трехслойные магнитные нанодиски (Au/Ni/Au) размером 500 нм (рис.1) были получены по технологиям микро- и нанoeлектроники, развиваемым на АО «НПП «Радиосвязь». Для получения наноскальпеля

магнитные нанодиски, отделенные от подложки ацетоном, трижды промывали фосфатным буфером путем центрифугирования в течение 15 мин при 12 тыс. об/мин и модифицировали аптамерами. Для этого праймеры с тиоловыми группами инкубировали с ДНК-аптамерами в эквимольных концентрациях (300 нМ) в течение 18 часов при 4 °С для получения гибридов. Затем к раствору добавляли 30 мМ раствор ТрисClO₄-буфера (рН 8,6) в соотношении 1:3 (ТрисClO₄-буфер:ДНК-гибрид), смешивали с магнитными нанодисками из расчёта 10⁶ молекул гибрида на один диск и инкубировали в течение 24 часов при температуре 4°С. После инкубации нанодиски с иммобилизованными на их поверхности аптамерами промывали в фосфатном буфере. В качестве модели опухолевых клеток использовали асцитные клетки карциномы Эрлиха.

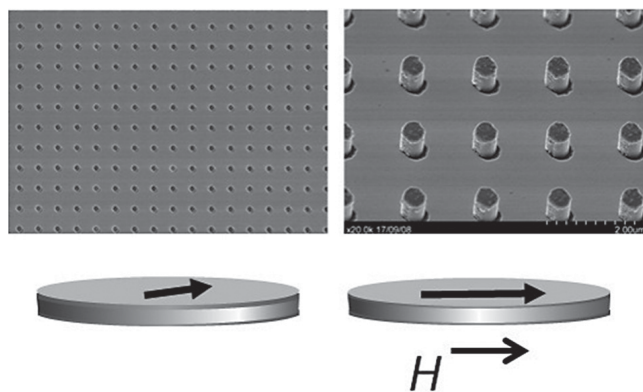


Рисунок 1. Трехслойные магнитные нанодиски (Au/Ni/Au) с квазидипольной структурой, изготовленные методом электронной фотолитографии на АО «НПП «Радиосвязь». Сверху – магнитные нанодиски на подложке. Снизу – намагниченность дисков во внешнем магнитном поле.

Результаты и обсуждение

В работе исследовалась способность наноскальпеля, состоящего из магнитных нанодисков и биораспознающих молекул, осуществлять деструкцию опухолевых клеток в условиях переменного магнитного поля. Используемые для этого нанодиски обладали магнитной анизотропией (Рис. 1) и были высоко чувствительны к магнитным раздражителям, поскольку, обладая нулевой суммарной намагниченностью в отсутствие поля, в условиях слабых внешних магнитных полей приобретали высокую намагниченность [5]. Адресность наноскальпеля достигалась путем функционализации магнитных дисков биораспознающими молекулами, в качестве которых были использованы ДНК-аптамеры, представляющие собой фрагменты односторонней РНК или ДНК, образующие трехмерные структуры при взаимодействии комплементарных участков цепи, связывающиеся,

благодаря уникальной конформации, со специфическими мишенями. В качестве таких биораспознающих молекул использовали ДНК-аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха AS9 [6], предполагаемой мишенью которых является белок филамина А – структурный компонент цитоскелета, играющий важную роль в клеточной сигнализации [7].

Результаты исследования магнитомеханической деструкции асцитных клеток с помощью трехслойных магнитных нанодисков (Au/Ni/Au), функционализированных аптамерами, показали, что магнитные нанодиски запускают в культуре асцитных клеток процессы клеточной гибели очень быстро – в течение двух часов, при этом в контрольных пробах гибели асцитных клеток не наблюдается (рис. 2).

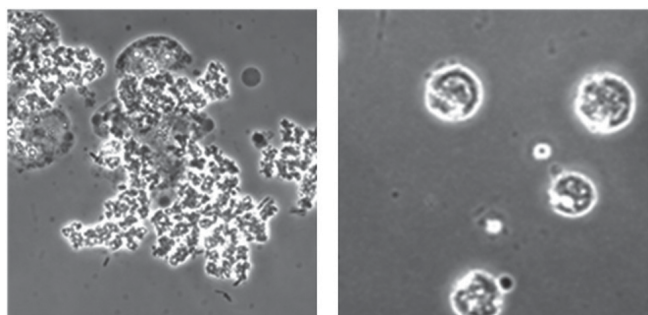


Рисунок 2. Противоопухолевый эффект магнитных дисков с квазидипольной магнитной структурой. Параметры переменного магнитного поля – 50 Гц, 150 Э. Слева – асцитные клетки, проинкубированные с магнитными дисками и помещенные на 20 мин в переменное магнитное поле. Справа – асцитные клетки без дисков в отсутствие магнитного поля (контроль).

В целом разрушение опухолевых клеток с помощью нанодисков может происходить в результате некроза или апоптоза. Некроз возникает в результате механического разрушения клеточной мембраны (магнитопорации) или разрушения всей клетки (магнитолиза). Для организма некроз представляет собой неблагоприятный способ деструкции опухолевых клеток, поскольку вызывает воспалительный процесс вследствие попадания лизосомальных ферментов в межклеточное пространство. Поэтому наиболее благоприятным для организма способом гибели опухолевых клеток является апоптоз, который в раковых клетках подавлен из-за онкогенных мутаций. Апоптоз не сопровождается воспалительным процессом, поэтому необходимо подбирать такие характеристики магнитного поля, которые стимулируют апоптоз опухолевых клеток [8]. В наших исследованиях эффект наноскальпеля был настолько велик, что приводил к разрушению клеточной мембраны, чем вызывал некротическую гибель клеток (рис. 2), что в целом

приемлемо для интраоперационного вмешательства, после которого ткань отмывается от разрушенных клеток и магнитных нанодисков.

Таким образом, можно заключить, что микрохирургия злокачественных опухолей с помощью наноскальпеля на основе функционализированных распознающими опухолевые сайты лигандов может быть использована для удаления одиночных опухолевых клеток во время оперативного вмешательства.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-02-00696 «Ферромагнитные наноструктуры (плёночные нанопятна, нанополосы, нанотрубки) и их ансамбли».

Литература / References

1. Vergés M, Costo R, Roca AG, Marco JP, Goya GF, Serna CJ, Morales MP. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain-multidomain limit. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2008;(41):134003.
2. Goiriena-Goikoetxea M, Munoz D, Orue I, Fernandez-Gubieda ML, Bokor J, Muela A, Garcia-Arribas A. Disk-shape magnetic particles for cancer therapy. *Applied Physics Reviews*. 2020;(7):011306.
3. Kim D-H, Rozhkova EA, Ulasov I, Novosad V. Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction. *Nature Materials*. 2010;(9):165-171.
4. Kim PD, Zamay SS, Zamay TN, Prokopenko VS, Kolovskaya OS, Zamay GS, Princ VY, Seleznev VA, Komov AI, Spivak EA, Rudenko RY, Dybinina AV, Komarov AV, Denisenko VV, Komarova MA, Sokolov AE, Narodov AA, Zjivaev VP, Zamay AS. The antitumor effect of magnetic nanodiscs and DNA aptamer conjugates. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2015;466(5):616-619.
5. Stolberg S, McCloskey KE. Can shear stress direct stem cell fate? *Biotechnology Progress*. 2009;25(1):10-19.
6. Kolovskaya OS, Zamay TN, Zamay AS, Glazyrin YE, Spivak EA, Zubkova OA, Kadkina AV, Erkaev EN, Zamay GS, Savitskaya AG, Trufanova LV, Petrova LL, Berezovski MV. DNA-aptamer/protein interaction as a cause of apoptosis and arrest of proliferation in Ehrlich ascites adenocarcinoma cells. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2014;8(1):60-72.
7. Xi J, Yue J, Lu H, Campbell N, Yang Q, Lan S, Haffty BG, Yuan C, Shen Z. Inhibition of filamin A reduces cancer metastatic potential. *International Journal of Biological Sciences*. 2013; 9(1):67-77.
8. Leulmi S, Chauchet X, Morcrette M, Ortiz G, Joisten H, Sabon P, Livache T, Hou Y, Carrière M, Lequena S, Diény B. Triggering the apoptosis of targeted human renal cancer cells by the vibration of anisotropic magnetic particles attached to the cell membrane. *Nanoscale*. 2015;(7):15904-15914.

Сведения об авторах

Замай Сергей Сергеевич, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» СО РАН; адрес: Российская Федерация, 660036, г. Красноярск, Академгородок, стр. 50; тел.: +7(391)2201893; e-mail: sergey-zamay@yandex.ru

Прокопенко Владимир Семёнович, доцент, Красноярский государственный педагогический университет им. В. П. Астафьева; адрес: Российская Федерация, 660049, г. Красноярск, ул. Ады Лебедевой, 89; тел.: +7(391)2171777; e-mail: plufe@yandex.ru

Лукьяненко Кирилл Андреевич, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» СО РАН; адрес: Российская Федерация, 660036, г. Красноярск, Академгородок, стр.50; тел.: +7(391)2201893; e-mail: k.a.lukyanenko@yandex.ru

Соколов Алексей Эдуардович, старший научный сотрудник, адрес: Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» СО РАН; адрес: Российская Федерация, 660036, г. Красноярск, Академгородок, стр.50; тел.: +7(391)2201893; e-mail: alexeys@iph.krasn.ru

Author information

Sergey S. Zamay, Senior Researcher, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"; Address: 50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, Russian Federation 660036; Phone: +7(391)2201893; e-mail: sergey-zamay@yandex.ru

Vladimir S. Prokopenko, professor, V.P. Astafiev Krasnoyarsk State Pedagogical University; Address: 89, A. Lebedeva Str., Krasnoyarsk Russian Federation 660049; Phone: +7(391)2171777; e-mail: plufe@yandex.ru

Kirill A. Lukyanenko, Researcher, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"; Address: 50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, Russian Federation 660036; Phone: +7(391)2201893; e-mail: k.a.lukyanenko@yandex.ru

Aleksey E. Sokolov, Senior Researcher, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"; Address: 50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, Russian Federation 660036; Phone: +7(391)2201893; e-mail: alexeys@iph.krasn.ru

Дата поступления: 17.02.2021

Дата рецензирования: 18.03.2021

Принята к печати: 31.03.2021

Received 17 February 2021

Revision Received 18 March 2021

Accepted 31 March 2021