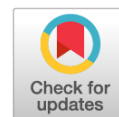


DOI: <https://doi.org/10.17816/onco633809>

Интраоперационное окрашивание злокачественных опухолей лёгкого с помощью биоорганических флуоресцентных золотых нанокластеров, связанных с аптамерами

Г.С. Замай^{1,2}, Т.Н. Замай^{1,2}, Д.С. Чумаков³, С.А. Сидоров^{1,4}, А.В. Крат^{1,4}, Б.Н. Хлебцов^{3,5}, И.А. Щугорева^{1,2}, А.А. Кошманова¹, Р.А. Зуков^{1,4}, Н.Г. Хлебцов^{3,5}, А.С. Кичкайло^{1,2}

¹ Красноярский государственный медицинский университет имени В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия;

² Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия;

³ Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия;

⁴ Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского, Красноярск, Россия;

⁵ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Проблема рецидивирования, генерализации или метастазирования рака лёгкого до настоящего времени остаётся актуальной, несмотря на развитие диагностических и терапевтических методов лечения. Основным методом лечения локализованного рака лёгкого — хирургический. Объём резекции определяется локализацией опухоли, её распространением на окружающие ткани и статусом поражения лимфоузлов. Однако даже после удаления большей части лёгкого в здоровой ткани могут оставаться метастатические очаги. Для улучшения эффективности диагностики при операции может применяться флуоресцентно-навигационная хирургия, основанная на использовании флуоресцентных красителей, позволяющая видеть даже небольшие скопления злокачественных клеток на ранних стадиях развития опухолевого процесса.

Цель. Разработка препарата для флуоресцентно-навигационной хирургии на основе аптамеров и флуоресцентных нанокластеров золота (длины волн возбуждения флуоресценции — 365–410 нм, длины волн эмиссии — 615–650 нм).

Материалы и методы. Объект исследования — первичные культуры немелкоклеточного рака лёгкого. Для доставки золотых нанокластеров, стабилизированных глутатионом (GSH-AuNC) или альбумином бычьей сыворотки (BSA-AuNC), к клеткам рака лёгкого использовали липосомы, функционализированные ДНК-аптамером LC-17. Электронно-микроскопические изображения синтезированных нанокластеров получали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Анализ эффективности связывания опухолевых клеток с функционализированными аптамерами липосомами, содержащими нанокластеры, проводили методом проточной цитометрии. Для оценки эффективности флуоресцентных нанокластеров использовали ткань аденокарциномы лёгкого.

Результаты. Диаметр нанокластеров BSA-AuNC и GSH-AuNC составил $1,8 \pm 0,5$ и $1,5 \pm 0,3$ нм, соответственно. При возбуждении светом с длиной волны 365 нм максимум эмиссии флуоресценции для BSA-AuNC составил 655 нм, а для GSH-AuNC — 613 нм. Квантовые выходы флуоресценции для BSA-AuNC и GSH-AuNC составили 6 и 14%, соответственно. Функционализированные аптамером LC-17 липосомы с включёнными в них GSH-AuNC и BSA-AuNC эффективно связывались с клетками аденокарциномы лёгкого и окрашивали их.

Заключение. Показана потенциальная возможность использования золотых нанокластеров, стабилизированных GSH-AuNC и BSA-AuNC, для флуоресцентно-навигационной хирургии.

Ключевые слова: аптамер; флуоресцентные золотые нанокластеры; липосомы; флуоресцентно-навигационная хирургия; рак лёгкого.

Как цитировать:

Замай Г.С., Замай Т.Н., Чумаков Д.С., Сидоров С.А., Крат А.В., Хлебцов Б.Н., Щугорева И.А., Кошманова А.А., Зуков Р.А., Хлебцов Н.Г., Кичкайло А.С. Интраоперационное окрашивание злокачественных опухолей лёгкого с помощью биоорганических флуоресцентных золотых нанокластеров, связанных с аптамерами // Российский онкологический журнал. 2024. Т. 29, № 2, С. 82–92. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco633809>

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco633809>

Intraoperative staining of malignant lung tumors using bioorganic fluorescent gold nanoclusters bound to aptamers

Galina S. Zamay^{1,2}, Tatiana N. Zamay^{1,2}, Daniil S. Chumakov³, Semen A. Sidorov^{1,4}, Aleksey V. Krat^{1,4}, Boris N. Khlebtsov^{3,5}, Irina A. Shchugoreva^{1,2}, Anastasia A. Koshmanova¹, Ruslan A. Zukov^{1,4}, Nikolai G. Khlebtsov^{3,5}, Anna S. Kichkailo^{1,2}

¹ Professor V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia;

² Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Krasnoyarsk, Russia;

³ Federal Research Centre "Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences", Saratov, Russia;

⁴ Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Dispensary named after A.I. Kryzhanovsky, Krasnoyarsk, Russia;

⁵ Saratov State University, Saratov, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The problem of recurrence, generalization, or metastasis of lung cancer remains relevant to this day, despite the advances in diagnostic and therapeutic methods of treatment. The main method of localized lung cancer treatment is surgery. The volume of resection is determined by the location of the tumor, its spread to surrounding tissues and the status of lymph node damage. However, even after removal of a large part of the lung, metastatic foci may remain in healthy tissue. To improve the effectiveness of diagnostics during surgery, fluorescence-navigated surgery can be used, based on the use of fluorescent dyes, which enables to see even small clusters of malignant cells in the early stages of tumor process development.

AIM: To develop a drug for fluorescence-navigation surgery based on aptamers and fluorescent gold nanoclusters (fluorescence excitation wavelengths are 365–410 nm, emission wavelengths are 615–650 nm).

MATERIALS AND METHODS: The object of the study is primary cultures of non-small cell lung cancer. Liposomes functionalized with DNA aptamer LC-17 were used to deliver gold nanoclusters stabilized with glutathione (GSH-AuNC) or bovine serum albumin (BSA-AuNC) to lung cancer cells. Electron microscopic images of the synthesized nanoclusters were obtained using transmission electron microscopy. Analysis of the efficiency of tumor cell binding to aptamer-functionalized liposomes containing nanoclusters was performed using flow cytometry. Lung adenocarcinoma tissue was used to evaluate the efficiency of fluorescent nanoclusters.

RESULTS: The diameter of BSA-AuNC and GSH-AuNC nanoclusters was 1.8 ± 0.5 nm and 1.5 ± 0.3 nm, respectively. When exciting by light with a wavelength of 365 nm, the maximum fluorescence emission for BSA-AuNCs was 655 nm, and for GSH-AuNCs — 613 nm. The fluorescence quantum yields for BSA-AuNCs and GSH-AuNCs were 6% and 14%, respectively. LC-17 aptamer-functionalized liposomes with included GSH-AuNC and BSA-AuNC effectively bound to lung adenocarcinoma cells and stained them.

CONCLUSION: The possibility of using gold nanoclusters stabilized by GSH-AuNC and BSA-AuNC for fluorescence-guided surgery is demonstrated.

Keywords: aptamer; fluorescent gold nanoclusters; liposomes; fluorescence-guided surgery; lung cancer.

To cite this article:

Zamay GS, Zamay TN, Chumakov DS, Sidorov SA, Krat AV, Khlebtsov BN, Shchugoreva IA, Koshmanova AA, Zukov RA, Khlebtsov NG, Kichkailo AS. Intraoperative staining of malignant lung tumors using bioorganic fluorescent gold nanoclusters bound to aptamers. *Russian Journal of Oncology*. 2024;29(2):82–92. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco633809>

ОБОСНОВАНИЕ

В настоящее время, несмотря на развитие диагностических и терапевтических методов лечения рака лёгкого, проблема его рецидивирования, генерализации или метастазирования остаётся актуальной. Частота возникновения рецидива немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) в позднем послеоперационном периоде составляет около 45% [1], а его локализация варьирует в зависимости от стадии заболевания. Так, отдалённые метастазы могут наблюдаться в 73% случаев, локорегиональные метастазы — в 19%, а комбинация обоих — в 7% [2].

Основной метод лечения локализованного рака лёгкого — хирургический. Объём резекции определяется локализацией опухоли, её распространением на окружающие ткани и статусом поражения лимфоузлов. В случаях со злокачественным поражением долевого или главного бронхов может быть выполнена бронхопластическая операция [3]. Тем не менее даже после удаления большей части лёгкого метастатические очаги могут оставаться в здоровой ткани, поскольку они не имеют достаточного размера и степени злокачественности, чтобы визуально отличаться от неё.

После проведения терапии оставшиеся злокачественные клетки продолжают делиться, что приводит к образованию локорегиональных рецидивов и метастазированию в отдалённые органы. Для улучшения эффективности диагностики при операции может применяться флуоресцентно-навигационная хирургия (ФНХ), основанная на использовании флуоресцентных красителей. Эта процедура позволяет хирургам видеть небольшие скопления злокачественных клеток на ранних стадиях развития опухолевого процесса.

На сегодняшний день проведено множество исследований по ФНХ, использующих различные молекулярные комплексы флуоресцентных красителей со специфическими лигандами, такими как антитела, пептиды или аптамеры. Некоторые из препаратов уже проходят клинические или доклинические испытания [4].

Особую популярность во ФНХ приобрели инфракрасные красители, благодаря низкой фоновой флуоресценции и большой глубине проникновения излучения. Ограничения, связанные с использованием таких красителей, включают наличие специального оборудования, кроме того, при использовании инфракрасного режима во время ФНХ хирурги могут визуализировать только флуоресценцию красителя, что делает топографию тканей неразличимой для глаза. Антитела или пептиды, используемые в существующих адресных красителях для флуоресцентно-навигационной диагностики, и могут вызывать тяжёлые аллергические реакции у пациентов [5].

В связи с этим разработку новых адресных флуоресцентных комплексов с такими оптическими

характеристиками, которые оптимальны для хирургии, а, именно, обладающими выраженной специфичностью, высоким отношением флуоресценции опухоли к фону и низкой токсичностью, является актуальной.

В данном исследовании мы представляем конъюгаты на основе липосом и аптамеров, адресно доставляющие в опухоль золотые нанокластеры, которые могут возбуждаться и испускать в диапазоне порфирина-IX (возбуждение: 400–410 нм, испускание: 650–710 нм). Такие красители могут визуализироваться с помощью хирургических флуоресцентных микроскопов или невооружённым глазом при ультрафиолетовом возбуждении. Существенным преимуществом красителей, испускающих в этом диапазоне, является отсутствие аутофлуоресценции тканей, что приводит к усилению контраста окрашенных опухолевых участков.

Аптамеры являются предпочтительными адресными агентами из-за низкой иммуногенности, малого размера (способствующего проникновению в ткани и быстрому выведению из организма), доступности и простоты химического синтеза и модификаций [6].

Флуоресцентные золотые нанокластеры (AuNC) представляют собой ультрамалые (1–3 нм) комплексы золотых атомов, стабилизированных органическими лигандами. AuNC обладают свойствами, которые делают их перспективными агентами для интраоперационной флуоресцентной диагностики. Преимуществами AuNC являются относительная простота синтеза, высокая фотостабильность, возможность спектральной настройки эмиссии флуоресценции и большой Стоксов сдвиг. По сравнению с неорганическими квантовыми точками AuNC менее токсичны. Из нанокластеров наиболее подробно изучены и охарактеризованы золотые нанокластеры, стабилизированные глутатионом (GSH-AuNC) и бычьим сывороточным альбумином (BSA-AuNC), которые имеют более высокий квантовый выход флуоресценции по сравнению с другими наноструктурами этого типа [7, 8].

Цель исследования — разработка препарата для ФНХ на основе аптамеров и флуоресцентных нанокластеров золота (длины волн возбуждения флуоресценции: 365–410 нм, длины волн эмиссии 615–650 нм).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Для проточной цитометрии использовали первичные культуры аденокарциномы лёгкого. Для визуальной оценки связывания комплексов использовали послеоперационные ткани аденокарциномы лёгкого.

Всего в исследование включены образцы, полученные от 4 пациентов с НМРЛ. Подробное описание представлено в табл. 1, все диагнозы подтверждены морфологически.

Таблица 1. Образцы послеоперационной ткани, включённые в исследование
Table 1. Postoperative tissue samples

Вид исследования	Тип образца	Гистологический тип	Стадия
Проточная цитометрия	Первичная культура	Аденокарцинома	T4N3M0
		Аденокарцинома	T3N2M0
		Аденокарцинома	T4N2M0
Визуальная оценка	Послеоперационная ткань	Аденокарцинома	T3N0M0

Продолжительность исследования и условия проведения

Золотые нанокластеры были получены и охарактеризованы в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр “Саратовский научный центр Российской академии наук”». Исследование проводили с марта 2021 года по декабрь 2023 года. Получение комплексов нанокластеров в липосомах, модифицированных аптамерами, проводили на базе Лаборатории цифровых управляемых лекарств и тераностики федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» в период с января по март 2024 года. Анализ связывания комплексов с первичными культурами и послеоперационными материалами проводились с марта 2024 по май 2024 на базе Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Объект исследования

Опухолевые ткани были получены от пациентов с НМРЛ, которым была выполнена радикальная операция в Краевом государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского». Перед сбором образцов было получено письменное информированное согласие от всех пациентов на анализ послеоперационных материалов в научно-исследовательской лаборатории. Опухолевые ткани были асептически удалены и помещены в охлаждённую среду DMEM, с пенициллином и стрептомицином. Образцы были доставлены в лабораторию в течение двух часов после резекции для дальнейших исследований и культивирования клеток.

В исследовании был использован ДНК-аптамер LC-17, полученный к опухолевым клеткам НМРЛ [9]. Специфичность аптамера к клеткам ткани, циркулирующим опухолям и белкам плазмы крови была изучена ранее [10, 11].

Выделение и культивирование клеток

Опухолевые ткани промывали средой DMEM. Ткани измельчали, а сосуды, некротические очаги и тромбы удаляли. Оставшиеся ткани диссоциировали с помощью дозатора. Затем суспензия проходила фильтрацию через фильтр с порами 70 мкм и осаждалась дважды путём центрифугирования при 2000 об/мин в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 2 мл DPBS, затем наслаивали 3 мл среды для разделения лимфоцитов (Lymphocytes Separation Media) и центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. Слой клеток на границе среды для разделения лимфоцитов и DPBS собирали и переносили в стерильную пробирку с DPBS, а затем центрифугировали в течение 5 мин при 2000 об/мин. Осадок переносили в пробирку для культивирования или контейнер со средой (DMEM, 10% плазменной фетальной сыворотки, 20 мкг/мл инсулина, 10 мкг/мл трансферрина, 25 нмол/л селенита натрия, 100 U/мл антибиотиков, 1 нг/мл фактора роста эпидермальных клеток) и выращивали в атмосфере с 5% CO₂ при 37 °C. Когда клетки достигали конfluence, их рассевали восстановительным раствором Trypsin-Versene для пересева клеток. Клетки промывали фосфатным буфером, содержащим Ca²⁺ и Mg²⁺, путём центрифугирования в течение 3 минут при 2500 об/мин и выращивали в ростовой среде, содержащей DMEM, 5% плазменной фетальной сыворотки, 20 мкг/мл инсулина, 10 мкг/мл трансферрина, 25 нмол/л селенита натрия и 100 U/мл антибиотиков.

Приготовление липосом

Для приготовления липосом использовали смесь липидов (набор для липосом, Sigma-Aldrich, Германия), содержащую холестерин, L-α-фосфатидилхолин и стеариламин. Молярное соотношение L-α-фосфатидилхолина, стеариламина и холестерина в смеси составляло 63:18:9, соответственно. Липосомы были приготовлены с помощью метода гидратации плёнки с последующей соникацией. Изначально липиды растворяли в 5 мл хлороформ-метаноловой смеси (3:1). Растворитель испаряли с помощью вращающегося испарителя для получения сухой плёнки липидов. Сухую плёнку липидов затем гидратировали, добавляя 50 мл DPBS (pH 7.4) при комнатной температуре в течение 10 минут. После гидратации липосомы подвергались соникации в ультразвуковой ванне в течение 30 минут при 25 °C для обеспечения

правильного смешивания и формирования липосом. Полученные липосомы хранили при 4 °C для дальнейшего использования.

Функционализация липосом

Липосомы были функционализированы аптамером LC-17, модифицированным холестеролом на 3'-конце и метилфлуоресцеином (FAM) на 5'-конце, в конечной концентрации 0,5 мкМ. Для инкорпорации аптамера в липидный слой липосом образец инкубировали при 60 °C в течение одного часа. После инкубации смесь сразу помещали на лёд на 5 минут для восстановления конформации аптамера.

Синтез и характеристика флуоресцентных золотых нанокластеров

Всю стеклянную посуду, в которой осуществляли синтез, предварительно промывали царской водкой ($\text{HCl}/\text{HNO}_3=3:1$), а далее ополаскивали этанолом и водой. Для синтеза флуоресцентных AuNC на основе глутатиона (GSH-AuNC) использовали следующую технологию. В стеклянном флаконе смешивали 1,5 мл 100 мМ раствора восстановленного глутатиона и 43,5 мл воды очищенной и перемешивали. Затем к полученному раствору добавляли 5 мл 20 мМ золотостандартного раствора. Полученную смесь перемешивали в течение 2 минут. Далее реакционную смесь инкубировали в термостате в течение 24 часов при 70 °C без перемешивания. Для синтеза стабилизированных альбумином флуоресцентных золотых нанокластеров (BSA-AuNC) использовали следующую методику. В стеклянном флаконе смешивали 25 мл 38,4 мг/мл BSA и 25 мл 11,6 мМ золотостандартного раствора. Смесь интенсивно перемешивали на магнитной мешалке в течение 2 минут. На следующем этапе к реакционной смеси добавляли 2 мл 1 М раствора натрия гидроксида. Далее реакционную смесь нагревали при 90 °C в течение 45 минут при интенсивном перемешивании.

Электронно-микроскопические изображения синтезированных нанокластеров получали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Микроскопические изображения получали с помощью микроскопа Libra-120 (Carl Zeiss, Германия) в центре коллективного пользования исследовательского оборудования в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии "Симбиоз" в ИБФРМ РАН. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции синтезированных нанокрасителей регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent, США).

Включение нанокрасителей (GSH-AuNC и BSA-AuNC) в функционализированные аптамером LC-17 липосомы

Липосомы инкубировали с нанокластерами на шейкере при 4 °C в течение 12 часов. Это позволило флуорофору войти внутрь липосом. После загрузки нанокластеров

липосомы были перенесены в диализный мешочек и помещены в фосфатный буфер, содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+} на 5 часов при температуре 4 °C для удаления избытка флуорофоров, не вошедших в липосомы. Для разрушения существующих агрегатов и обеспечения равномерного распределения липосом суспензию помещали в ультразвуковую ванну на 30 минут.

Анализ эффективности связывания опухолевых клеток липосом, содержащих нанокластеры и функционализированных аптамерами

Связывание липосом, содержащих золотые нанокластеры, с клетками рака лёгкого анализировали с помощью проточного цитометра FC-500 (Beckman Coulter Inc., США). Клетки рака лёгкого, полученные из культуры, предварительно инкубировались с 1 нг/мл дрожжевой РНК в течение 30 минут на шейкере при комнатной температуре.

Затем смесь клеток инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с липосомами, содержащими GSH-AuNCs и BSA-AuNCs, которые были связаны с аптамером LC-17. Чтобы избежать неспецифического связывания клеток рака лёгкого с липосомами, смесь отмывали путём центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 минут. Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Kaluza 1.1 (Beckman Coulter Inc., США).

Окрашивание послеоперационной ткани

Для оценки эффективности флуоресцентных наноконструкций использовалась ткань аденокарциномы средней доли правого лёгкого T3N0M0. Диагноз подтверждён морфологически. Наноконструкции наносили на ткань лёгкого, для визуализации связывания использовали источник ультрафиолетового излучения. Через 3 минуты после окрашивания ткань трижды промывали фосфатным буфером и оценивали свечение.

Этическая экспертиза

Исследование получило одобрение этического комитета Красноярского государственного медицинского университета (Протокол № 37/2012 от 31.01.2012).

Статистическая обработка

Морфометрические параметры нанокластеров были получены в результате обчёта ансамбля 200 нанокластеров на электронно-микроскопических изображениях. Полученные данные были представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$).

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 7.0. Проверку гипотезы о статистической достоверности различий выборок — с помощью критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика синтезированных нанокрасителей

Для получения золотых наноструктур используются различные методы, включающие традиционные химические технологии конденсации и экологически чистые «зелёные» подходы, при которых восстановление золота достигается с использованием растительных экстрактов [12, 13]. Синтез AuNC включал использование органических лигандов (L-глутатиона и бычьего сывороточного альбумина), которые действовали одновременно как восстанавливающие и стабилизирующие агенты. На рис. 1, *a*, *b* можно видеть изображения просвечивающей электронной микроскопии и спектры флуоресценции синтезированных нанокластеров. По данным обчёта размеров не менее 100 частиц на изображениях просвечивающей электронной микроскопии установлено, что диаметр BSA-AuNC и GSH-AuNC составил $1,8 \pm 0,5$ и $1,5 \pm 0,3$ нм,

соответственно. При возбуждении светом с длиной волны 365 нм максимум эмиссии флуоресценции для BSA-AuNC составил 655 нм, а для GSH-AuNC — 613 нм. Рассчитанные квантовые выходы флуоресценции для BSA-AuNC и GSH-AuNC составили 6 и 14%, соответственно.

Создание липосом с инкапсулированными красителями на основе аптамеров

В исследовании золотые нанокластеры BSA-AuNC и GSH-AuNC инкапсулировали в липосомы с аптамером LC-17. Это позволило обеспечить доставку наночастиц к раковым клеткам лёгкого. Такая технология предлагает несколько преимуществ по сравнению с прямым связыванием аптамеров и нанокластеров через функциональные группы. Во-первых, таким образом увеличивается интенсивность флуоресценции, поскольку каждая липосома может нести несколько молекул флуорофора. Во-вторых, снижается токсичность, поскольку красители не контактируют напрямую с кровью или тканями пациентов. В-третьих, продлевается время циркуляции комплексов,

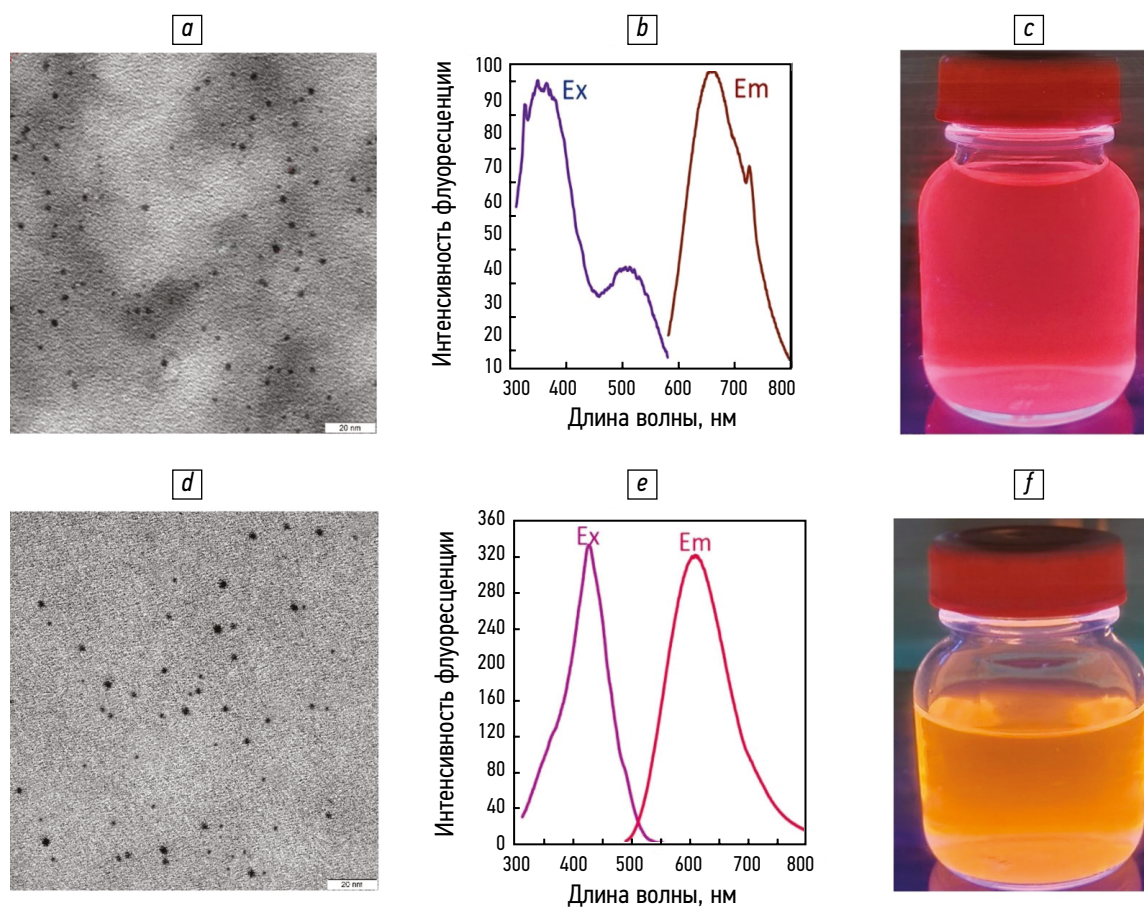


Рис. 1. *a* — просвечивающая электронная микроскопия, изображение BSA-AuNC (масштабная линейка 20 нм); *b* — спектры флуоресценции BSA-AuNC; *c* — суспензия BSA-AuNC при облучении ультрафиолетовой лампой (365 нм); *d* — просвечивающая электронная микроскопия, изображение GSH-AuNC (масштабная линейка 20 нм); *e* — спектры флуоресценции GSH-AuNC; *f* — суспензия GSH-AuNC при облучении ультрафиолетовой лампой (365 нм).

Fig. 1. *a* — transmission electron microscopy image of the BSA-AuNCs (scale bar is 20 nm); *b* — fluorescence spectra of the BSA-AuNCs; *c* — BSA-AuNCs suspension under ultraviolet lamp irradiation (365 nm); *d* — transmission electron microscopy image of the GSH-AuNCs (scale bar is 20 nm); *e* — fluorescence spectra of the GSH-AuNCs; *f* — GSH-AuNCs suspension under ultraviolet lamp irradiation (365 nm).

улучшается их стабильность и обеспечивается адресность их доставки.

Для визуализации связывания аптамера с липосомой была построена третичная структура аптамера LC-17 (рис. 2, а). Полностью комплекс аптамер–липосома–золотой нанокластер представлен на рис. 2, б.

Оценка эффективности связывания нанокрасителей, инкапсулированных в функционализированные аптамерами липосомы, с опухолевыми клетками и тканями *ex vivo*

Эффективность связывания нанокрасителей, инкапсулированных в функционализированные аптамерами

липосомы, была оценена методом проточной цитометрии с помощью цитометра FC-500 (Beckman Coulter, США). Нанокластеры BSA-AuNC и GSH-AuNC демонстрировали флуоресценцию в красной спектральной области, а аптамер, меченный FAM, — в зелёной. Таким образом, флуоресцентный сигнал детектировался в двух каналах — FL1 для FAM и FL4 для BSA-AuNC и GSH-AuNC.

Для оценки эффективности связывания нанокластеров с биологическими образцами были получены первичные культуры рака лёгкого из послеоперационного материала.

Как видно из рис. 3, флуоресцентные сигналы от самих клеток культуры рака лёгкого не детектировались, однако при окрашивании комплексами, содержащими

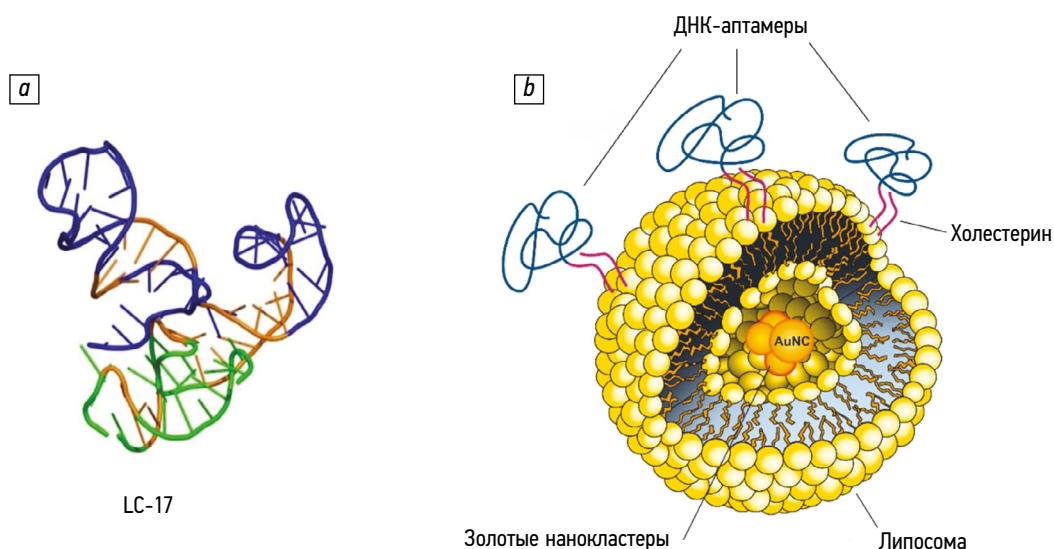


Рис. 2. Третичная структура аптамера. а — модель аптамера LC-17, б — схема, изображающая связку LC-17-липосома–золотой нанокластер.

Fig. 2. The tertiary structure of the aptamer. а — the LC-17 aptamer model; б — a diagram depicting the LC17-liposome–gold nanocluster.

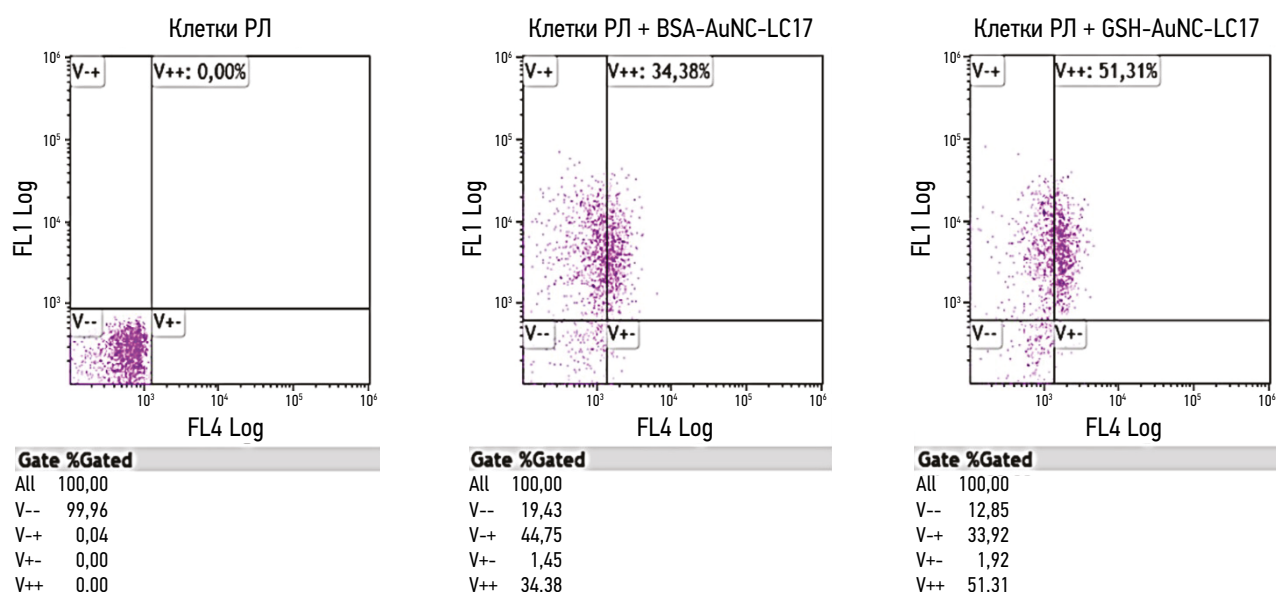


Рис. 3. Проточная цитометрия клеток рака лёгкого, окрашенных липосомами, содержащими GSH-AuNC или BSA-AuNC, связанные с аптамером LC-17.

Fig. 3. Flow cytometry of lung cancer cells stained with liposomes containing GSH-AuNCs or BSA-AuNCs associated with the LC-17 aptamer.

аптамер LC-17 и нанокрасители GSH-AuNC и BSA-AuNC, обнаруживалась флуоресценция в каналах FL1 и FL4.

Для оценки связывания полученной наноконструкции с тканью рака лёгкого *ex vivo* опухоль была разделена на несколько частей и окрашена одним из комплексов липосом и нанокрасителей или фосфатным буфером в качестве контроля (рис. 4).

Из рис. 4 видно, что аутофлуоресценции опухоли не наблюдалось. Липосомы с включёнными GSH-AuNC, функционализированные аптамером LC-17, связывались с опухолевой тканью, что подтверждалось визуально красным свечением при освещении ультрафиолетом. Функционализированные аптамером LC-17 липосомы, содержащие BSA-AuNC, также окрашивали опухолевую ткань.

ОБСУЖДЕНИЕ

При удалении основных и метастатических очагов опухоли ФНХ к настоящему времени пока ещё не получила широкого распространения. Тем не менее есть исследования, подтверждающие перспективность этого метода, такие как применение метиленового синего, индоцианина зелёного или молекулы, специфичной к фолатному рецептору альфа аденокарциномы лёгкого [15, 16].

Так, например, С.Н. Li и соавт. использовали GSH-AuNC, функционализированный аптамером AS1411 с диатризовоей кислотой (AS1411-DA-AuNC), для окрашивания опухолей на животных моделях [17]. В работе аптамер был напрямую конъюгирован с AuNC с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC). Однако этот подход к конъюгации имеет свои ограничения, связанные с быстрым гидролизом EDC в водной среде, а также с тем, что многие золотые нанокластеры подвержены биодegradации и агрегации в биологической среде.

Новизна подхода, предложенного в настоящем исследовании, заключается в оригинальном дизайне комплекса, объединяющего три компонента:

- аптамер, специфичный к клеткам рака лёгкого;
- липосомы;
- флуоресцентные нанокластеры на основе альбумина или глутатиона, характеризующиеся большим Стоксовым сдвигом и относительно высоким квантовым выходом флуоресценции.

С точки зрения онкологии и экономики здравоохранения, применение флуоресцентных методов визуализации опухоли — как на диагностическом этапе, так и во время выполнения радикальной резекции опухоли — позволит избежать ранних рецидивов заболевания и повторных оперативных вмешательств, снизить количество курсов адъювантной противоопухолевой терапии за счёт повышения радикальности хирургического лечения. В результате такого подхода к лечению будет достигаться значительная экономия затрат на здравоохранение и повышение качества жизни пациентов. Стоит отметить, что увеличение разнообразия индукторов флуоресценции позволит увеличить спектр ФНХ и в других областях хирургии злокачественных новообразований и добиться более благоприятных результатов хирургического лечения пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из наиболее актуальных проблем при оперативном вмешательстве у больных раком лёгкого является процесс визуализации не только опухолевых очагов, но и микрометастазов, поскольку злокачественные клетки, оставшиеся в ткани, продолжают пролиферировать, вызывая рецидив и прогрессирование заболевания. В настоящем исследовании была изучена возможность применения липосом, нагруженных красителями BSA-AuNC и GSH-AuNC и модифицированных аптамером LC-17, для идентификации опухолевых очагов во время операции. Возможность интраоперационной визуализации опухолевой ткани была смоделирована на послеоперационном материале больного аденокарциномой лёгкого с использованием ультрафиолетового источника излучения. Показана потенциальная возможность

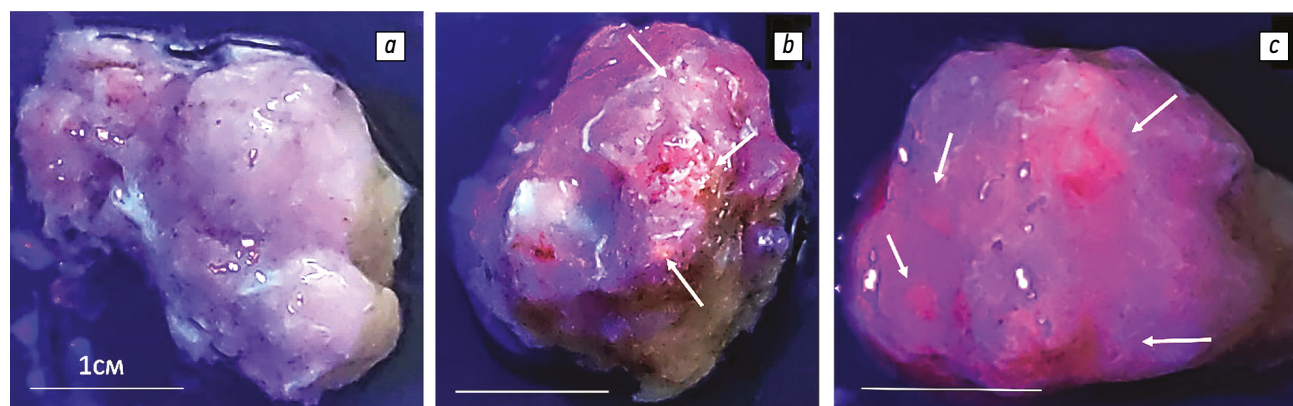


Рис. 4. Окрашивание ткани рака лёгкого *ex vivo*: *a* — ткань без окрашивания; *b* — ткань, окрашенная GSH-AuNC в липосомах, содержащих аптамер LC-17; *c* — ткань, окрашенная BSA-AuNC в липосомах, содержащих аптамер LC-17.

Fig. 4. *Ex vivo* staining of lung cancer tissue: *a* — without staining; *b* — stained with GSH-AuNCs in liposomes containing LC-17 aptamer; *c* — stained with BSA-AuNCs in liposomes containing LC-17 aptamer.

интеграции нанокластеров BSA-AuNC и GSH-AuNC на дооперационном этапе диагностики с целью определения очагов метастатического характера во ФНХ. В целом, разрабатываемый подход может изменить стратегию лечения пациентов с НМРЛ с точки зрения как критериев выполнения радикального оперативного вмешательства, так и проведения альтернативных неинвазивных методов лечения, в том числе противоопухолевой и лучевой терапии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследования и публикация осуществлены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации FWES-2022-0005 (А.С.К.). Получение и характеристика золотых нанокластеров выполнены в рамках государственного задания Минобрнауки РФ для Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр РАН», тема № 1022040700960-1.

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

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Г.С. Замай, Т.Н. Замай — проведение исследований, анализ и интерпретация данных, написание текста и редактирование статьи; Д.С. Чумаков — проведение исследований, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

С.А. Сидоров, Б.Н. Хлебцов — проведение исследований, анализ и интерпретация данных; А.В. Крат, И.А. Щугорева — проведение исследований, анализ данных; А.А. Кошманова — проведение исследований; Р.А. Зуков — редактирование рукописи; Н.Г. Хлебцов — концепция работы; А.С. Кичкайло — проведение исследований, анализ данных, редактирование статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. Research and publication were supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation FWES-2022-0005 (A.S.K.). The production and characterization of gold nanoclusters was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation for the Federal Research Center "Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", topic No. 1022040700960-1.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. Zamai GS, Zamai TN — conducting research, analyzing and interpreting data, writing the text and editing the article; Chumakov DS — conducting research, analyzing and interpreting data, editing the manuscript; Sidorov SA, Khlebtsov BN — conducting research, analyzing and interpreting data; Krat AV, Shchugoreva IA — conducting research, analyzing data; Koshmanova AA — conducting research; Zukov RA — manuscript editing; Khlebtsov NG — concept of the work; Kichkaylo AS — research, data analysis, article editing.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Higgins K.A., Chino J.P., Berry M., et al. Local failure in resected stage N1 lung cancer: implications for adjuvant therapy // *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012. Vol. 83, N 2. P. 727–733. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.07.018
2. Varlotto J.M., Yao A.N., DeCamp M.M., et al. Nodal stage of surgically resected non-small cell lung cancer and its effect on recurrence patterns and overall survival // *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2015. Vol. 91, N 4. P. 765–773. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.12.028
3. Burel J., Ayoubi M.E., Basté J.M., et al. Surgery for lung cancer: postoperative changes and complications—what the Radiologist needs to know // *Insights into Imaging*. 2021. Vol. 12. P. 116. doi: 10.1186/s13244-021-01047-w
4. Jiao J., Zhang J., Yang F., et al. Quicker, deeper and stronger imaging: A review of tumor-targeted, near-infrared fluorescent dyes for fluorescence guided surgery in the preclinical and clinical stages // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020. Vol. 152. P. 123–143. doi: 10.1016/j.ejpb.2020.05.002
5. Van Keulen S., Hom M., White H., Rosenthal E.L., Baik F.M. Evolution of fluorescence-guided surgery // *Molecular Imaging and Biology*. 2023. Vol. 25. P. 36–45. doi: 10.1007/s11307-022-01772-8
6. Крат А.В., Замай Т.Н., Замай Г.С., и др. Использование ДНК-аптамеров в оценке распространенности опухолевого процесса

- у больных раком легкого // *Сибирское медицинское обозрение*. 2016. Т. 5, № 101. С. 96–98. EDN: XDNMCL
7. Luo Z., Yuan X., Yu Y., et al. From aggregation-induced emission of Au(I)-thiolate complexes to ultrabright Au(0)@Au(I)-thiolate core-shell nanoclusters // *Journal of the American Chemical Society*. 2012. Vol. 134, N 40. P. 16662–16670. doi: 10.1021/ja306199p
8. Khlebtsov B., Tuchina E., Tuchin V., Khlebtsov N. Multifunctional Au nanoclusters for targeted bioimaging and enhanced photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* // *RSC Advances*. 2015. Vol. 5. P. 61639–61649. doi: 10.1039/C5RA11713E
9. Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zamay T.N., et al. Aptamers selected to postoperative lung adenocarcinoma detect circulating tumor cells in human blood // *Molecular Therapy*. 2015. Vol. 23, N 9. P. 1486–1496. doi: 10.1038/mt.2015.108
10. Zamay G.S., Ivanchenko T., Zamay T.N., et al. DNA-Aptamers for Characterization of Histological Structure of Lung Adenocarcinoma // *Molecular Therapy: Nucleic Acid*. 2016. Vol. 17, N 6. P. 150–162. doi: 10.1016/j.omtn.2016.12.004
11. Zamay G.S., Zamay T.N., Kolovskii V.A., et al. Electrochemical aptasensor for lung cancer-related protein detection in crude blood plasma samples // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 34350. doi: 10.1038/srep34350

12. Chumakov D., Pylaev T., Avdeeva E., et al. Anticancer properties of gold nanoparticles biosynthesized by reducing of chloroaurate ions with *Dunaliella salina* aqueous extract // *Proc SPIE: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine*. 2020. Vol. 11457. P. e1145715. doi: 10.1117/12.2564630
13. Saleh S.M., Almotiri M.K., Ali R. Green synthesis of highly luminescent gold nanoclusters and their application in sensing Cu (II) and Hg (II) // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2022. Vol. 426. P. e113719. doi: 10.1016/j.jphotochem.2021.113719
14. Holt D., Okusanya O., Judy R., et al. Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, N 7. P. e103342. doi: 10.1371/journal.pone.0103342

REFERENCES

1. Higgins KA, Chino JP, Berry M, et al. Local failure in resected stage N1 lung cancer: implications for adjuvant therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;83(2):727–733. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.07.018
2. Varlotto JM, Yao AN, DeCamp MM, et al. Nodal stage of surgically resected non-small cell lung cancer and its effect on recurrence patterns and overall survival. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2015;91(4):765–773. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.12.028
3. Burel J, Ayoubi ME, Basté JM, et al. Surgery for lung cancer: postoperative changes and complications—what the Radiologist needs to know. *Insights into Imaging*. 2021;12:116. doi: 10.1186/s13244-021-01047-w
4. Jiao J, Zhang J, Yang F, et al. Quicker, deeper and stronger imaging: A review of tumor-targeted, near-infrared fluorescent dyes for fluorescence guided surgery in the preclinical and clinical stages. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020;152:123–143. doi: 10.1016/j.ejpb.2020.05.002
5. Van Keulen S, Hom M, White H, Rosenthal EL, Baik FM. Evolution of fluorescence-guided surgery. *Molecular Imaging and Biology*. 2023;25:36–45. doi: 10.1007/s11307-022-01772-8
6. Krat AV, Zamay TN, Zamay GS, et al. The use of DNA aptamers in the estimation of the prevalence the tumor process in lung cancer patients. *Siberian Medical Review*. 2016;5(101):96–98. EDN: XDNMCL
7. Luo Z, Yuan X, Yu Y, et al. From aggregation-induced emission of Au(I)-thiolate complexes to ultrabright Au(0)@Au(I)-thiolate core-shell nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(40):16662–16670. doi: 10.1021/ja306199p
8. Khlebtsov B, Tuchina E, Tuchin V, Khlebtsov N. Multifunctional Au nanoclusters for targeted bioimaging and enhanced photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*. 2015;5:61639–61649. doi: 10.1039/C5RA11713E
9. Zamay GS, Kolovskaya OS, Zamay TN, et al. Aptamers selected to postoperative lung adenocarcinoma detect circulating tumor cells in human blood. *Molecular Therapy*. 2015;23(9):1486–1496. doi: 10.1038/mt.2015.108
10. Zamay GS, Ivanchenko T, Zamay TN, et al. DNA-Aptamers for Characterization of Histological Structure of Lung Adenocarcinoma. *Molecular Therapy: Nucleic Acid*. 2016;17(6):150–162. doi: 10.1016/j.omtn.2016.12.004
11. Zamay GS, Zamay TN, Kolovskii VA, et al. Electrochemical aptasensor for lung cancer-related protein detection in crude blood plasma samples. *Scientific Reports*. 2016;6:34350. doi: 10.1038/srep34350
12. Chumakov D, Pylaev T, Avdeeva E, et al. Anticancer properties of gold nanoparticles biosynthesized by reducing of chloroaurate ions with *Dunaliella salina* aqueous extract. *Proc SPIE: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine*. 2020;11457:e1145715. doi: 10.1117/12.2564630
13. Saleh SM, Almotiri MK, Ali R. Green synthesis of highly luminescent gold nanoclusters and their application in sensing Cu (II) and Hg (II). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2022;426:e113719. doi: 10.1016/j.jphotochem.2021.113719
14. Holt D, Okusanya O, Judy R, et al. Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation. *PLoS One*. 2014;9(7):e103342. doi: 10.1371/journal.pone.0103342
15. Newton AD, Kennedy GT, Predina JD. Intraoperative molecular imaging to identify lung adenocarcinomas. *Journal of Thoracic Disease*. 2016;8(9S):S697–S704. doi: 10.21037/jtd.2016.09.50
16. Rynda AY, Olyushin VE, Rostovtsev DM, Zabrodskaya YuM, Papayan GV. Comparative analysis of 5-ALA and chlorin E6 fluorescence-guided navigation in malignant glioma surgery. *Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2022;(1):5–14. doi: 10.17116/hirurgia20220115
17. Li CH, Kuo TR, Su HJ, et al. Fluorescence-guided probes of aptamer-targeted gold nanoparticles with computed tomography imaging accesses for in vivo tumor resection. *Scientific Reports*. 2015;5:e15675. doi: 10.1038/srep15675

ОБ АВТОРАХ

*** Замай Татьяна Николаевна**, д-р биол. наук;
адрес: Россия, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка,
д. 1;
ORCID: 0000-0002-7493-8742;
eLibrary SPIN: 8799-8497;
e-mail: tzamay@yandex.ru

Замай Галина Сергеевна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-2567-6918;
eLibrary SPIN: 6501-0371;
e-mail: galina.zamay@gmail.com

Чумаков Даниил Сергеевич, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-1658-2562;
eLibrary SPIN: 8491-2313;
e-mail: laik2012@yandex.ru

Сидоров Семён Александрович;
ORCID: 0000-0001-6676-6656;
eLibrary SPIN: 8740-5259;
e-mail: sidorov.syoma2014@yandex.ru

Крат Алексей Васильевич, канд. мед. наук;
ORCID: 0009-0006-5357-2637;
eLibrary SPIN: 2846-8592;
e-mail: alexkrat@mail.ru

Хлебцов Борис Николаевич, д-р физ.-мат. наук;
ORCID: 0000-0003-3996-5750;
eLibrary SPIN: 5274-8718;
e-mail: khlebtsov_b@ibppm.ru

Щугорева Ирина Андреевна, канд. хим. наук;
ORCID: 0000-0003-4207-1627;
eLibrary SPIN: 8826-6672;
e-mail: shchugorevai@mail.ru

Кошманова Анастасия Андреевна;
ORCID: 0000-0001-7339-8660;
eLibrary SPIN: 2217-2229;
e-mail: koshmanova.1998@mail.ru

Зуков Руслан Александрович, д-р мед. наук;
ORCID: 0000-0002-7210-3020;
eLibrary SPIN: 3632-8415;
e-mail: zukov.ra@krasgmu.ru

Хлебцов Николай Григорьевич, д-р физ.-мат. наук;
ORCID: 0000-0002-2055-7784;
eLibrary SPIN: 4377-1257;
e-mail: khlebtsov@ibppm.ru

Кичкайло Анна Сергеевна, д-р биол. наук;
ORCID: 0000-0003-1054-4629;
eLibrary SPIN: 5387-9071;
e-mail: annazamy@yandex.ru

AUTHORS' INFO

*** Tatiana N. Zamay**, Dr. Sci. (Biology);
address: 1 Partizan Zheleznyak street, Krasnoyarsk 660022,
Russia;
ORCID: 0000-0002-7493-8742;
eLibrary SPIN: 8799-8497;
e-mail: tzamay@yandex.ru

Galina S. Zamay, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-2567-6918;
eLibrary SPIN: 6501-0371;
e-mail: galina.zamay@gmail.com

Daniil S. Chumakov, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-1658-2562;
eLibrary SPIN: 8491-2313;
e-mail: laik2012@yandex.ru

Semen A. Sidorov;
ORCID: 0000-0001-6676-6656;
eLibrary SPIN: 8740-5259;
e-mail: sidorov.syoma2014@yandex.ru

Aleksey V. Krat, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0009-0006-5357-2637;
eLibrary SPIN: 2846-8592;
e-mail: alexkrat@mail.ru

Boris N. Khlebtsov, Dr. Sci. (Physics and Mathematics);
ORCID: 0000-0003-3996-5750;
eLibrary SPIN: 5274-8718;
e-mail: khlebtsov_b@ibppm.ru

Irina A. Shchugoreva, Cand. Sci. (Chemistry);
ORCID: 0000-0003-4207-1627;
eLibrary SPIN: 8826-6672;
e-mail: shchugorevai@mail.ru

Anastasia A. Koshmanova;
ORCID: 0000-0001-7339-8660;
eLibrary SPIN: 2217-2229;
e-mail: koshmanova.1998@mail.ru

Ruslan A. Zukov, MD, Dr. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-7210-3020;
eLibrary SPIN: 3632-8415;
e-mail: zukov.ra@krasgmu.ru

Nikolai G. Khlebtsov, Dr. Sci. (Physics and Mathematics);
ORCID: 0000-0002-2055-7784;
eLibrary SPIN: 4377-1257;
e-mail: khlebtsov@ibppm.ru

Anna S. Kichkailo, Dr. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-1054-4629;
eLibrary SPIN: 5387-9071;
e-mail: annazamy@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author