

РАЗРАБОТКА ИММУНОГЕННЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ БОРЬБЫ С РАКОВЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Е.А. Ветрова

Структурное подразделение БУ ОО ДО «Дворец пионеров и школьников им. Ю.А. Гагарина» Детский технопарк «Кванториум», г. Орёл
Научный руководитель: **А.Ю. Винокуров**, педагог дополнительного образования, структурное подразделение БУ ОО ДО «Дворец пионеров и школьников им. Ю.А. Гагарина» детский технопарк «Кванториум», г. Орёл

Введение. В настоящее время одной из самых актуальных проблем в области здравоохранения является борьба с онкологическими заболеваниями, которые стабильно занимают второе место среди причин смерти в мире.

Существует несколько стратегий лечения рака, которые, наряду с преимуществами, обладают существенными недостатками. Одним из перспективных подходов борьбы со злокачественными клетками могло бы быть использование возможностей иммунной системы. Однако раковые клетки умело скрываются от нее, вследствие чего она не распознает их и не атакует. Один из способов, предложенных ещё в 19 веке, чтобы заставить иммунные клетки бороться с раковыми, подразумевал использование болезнетворных бактерий. При введении в организм они накапливаются в опухоли и стимулируют иммунную систему. Последняя, в свою очередь, заодно с бактериями уничтожает и злокачественные новообразования. Однако при таком способе лечения увеличивается риск смерти от бактериальной инфекции. Проблема бактериальной терапии заключается в том, что все бактерии, с помощью которых была показана возможность вылечить рак, являются патогенными.

Решением проблемы может стать создание «конструкции», которая не является патогенной, но при этом обнаружит раковую опухоль и «пробудит» иммунитет. Именно проработка такой стратегии и получение модельных образцов конструкции представляют собой цель нашего проекта.

Основная часть. Разработанная конструкция состоит из следующих компонентов: 1) фосфолипиды (для создания основы – липосом), 2) гиалуроновая кислота (сигнальные молекулы для доставки в раковую опухоль), 3) мембранные белки *E. coli* (иммуностимуляторы). Согласно нашей гипотезе, такая «конструкция» может специфично связываться с опухолью и стимулировать иммунитет для разрушения ее клеток.

Малые однослойные липосомы мы получали методом замены растворителя. Затем определяли размер полученных липосом спектрофотометрическим методом. Так как размер липосом должен влиять на эффективность применения нашей конструкции, мы определили зависимость размера липосом от расхода лецитина. Наши эксперименты показали, что при расходе лецитина 0,0012 г/мл физиологического раствора образуются частицы размером 150 нм, которые являются оптимальными для решаемой задачи.

В качестве входящего в структуру «конструкции» иммуностимулирующего фактора мы выбрали мембранные белки *E. coli*. Для этого чистую культуру бактерий из препарата «Колибактерин» культивировали на среде LB. Выделение белков проводили в соответствии с запатентованной методикой выделения белков клеточной поверхности. Далее определяли содержание белка в выделенном препарате с помощью биуретового реактива спектрофотометрическим методом. Для проведения анализа нерастворимые в воде мембранные белки солюбилизировали в 8 М растворе мочевины. Общая масса выделенного белка в одной дозе препарата составила 0,5 мг.

Были выполнены расчеты по соотношению компонентов конструкции, в соответствии с которыми фосфолипиды и выделенные нами белки должны быть смешаны в соотношении

1:1, а фосфолипиды и гиалуроновая кислота в соотношении 10:1. В целях дальнейшей проверки способности частиц связываться с раковыми клетками к физиологическому раствору при получении наших частиц был добавлен краситель йодид пропидия, который применяется при оценке жизнеспособности клеточных культур, так как проникает только в мертвые клетки. Однако в нашем случае проникновение зонда в клетки может происходить и в результате эндоцитоза в том случае, если наша «конструкция» обладает способностью связываться с раковыми клетками.

Чтобы оценить способность частиц связываться с раковыми клетками, необходимо знать общее число клеток и количество клеток, окрашенных иодидом пропидия. Общее число клеток можно узнать с помощью красителя Hoechst, так как он окрашивает все клетки.

Однако нельзя исключать того, что некоторые клетки уже могут быть мёртвыми и, следовательно, связываться с зондом. Поэтому для сравнения мы приготовили физиологический раствор с красителем, но без частиц.

Следующий этап - проверка способности частиц связываться с онкоклетками. Предварительно клетки гепатокарциномы мыши НЗЗ культивировали на питательной среде в культуральных флаконах в CO₂-инкубаторе. Затем проводили пассаж клеток на предметные стекла, размещенные в чашки Петри. Через два дня культивирования из чашек Петри отбирали среду, которую заменяли сбалансированным солевым раствором Хенкса. После этого в чашки Петри вносили исследуемые частицы или такой же объем контрольного раствора.

Результат взаимодействия исследуемых частиц с клетками оценивали с помощью конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2. Было посчитано общее количество клеток, которые окрасились в салатовый цвет, и количество клеток, связавшихся с частицами (они окрасились в желто-зеленый цвет).

Доля клеток, окрашенных иодидом пропидия, в контрольном опыте составила 47%. Доля клеток, окрашенных иодидом пропидия, где были добавлены частицы, составила 77%.

Более высокая доля клеток, окрашенных йодидом пропидия, в опыте с использованием нашей «конструкции» говорит о том, что частицы способны к связыванию с онкоклетками и, возможно, активации иммунной системы по отношению к ним.

Выводы. Разработана модель иммуногенной «конструкции», сделано обоснование её состава; выполнены расчеты по соотношению входящих в состав компонентов конструкции частиц и определен оптимальный размер основы конструкции. Выполнена проверка и оценка способности иммуногенной «конструкции» связываться с раковыми клетками. Все это позволяет говорить о проработке стратегии получения иммуногенных частиц, которые не оказывают отрицательного влияния на организм, но при этом активизируют иммунную систему по отношению к раковой опухоли.

В дальнейшем планируется провести ряд экспериментов, показывающих, способна ли такая конструкция к активации иммунной системы.