

УДК 616.24-006.6-074:577.29.085.25

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-13-21>

Для цитирования: Глазырин Ю.Е., Шабалина А.В., Рыжинская К.А., Замай С.С., Коловский В.А., Светличный В.А., Лапин И.Н., Замай Г.С., Коловская О.С., Замай Т.Н., Пац Ю.С., Кичкайло А.С. Скрининг белков-биомаркеров рака легкого с помощью мультиплексной электрохимической сенсорной системы на основе аптамеров. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (3): 13–21.

Скрининг белков-биомаркеров рака легкого с помощью мультиплексной электрохимической сенсорной системы на основе аптамеров

Глазырин Ю.Е.^{1,2}, Шабалина А.В.³, Рыжинская К.А.³, Замай С.С.¹,
Коловский В.А.¹, Светличный В.А.³, Лапин И.Н.³, Замай Г.С.^{1,2},
Коловская О.С.^{1,2}, Замай Т.Н.², Пац Ю.С.², Кичкайло А.С.^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр (ФИЦ) КНИЦ СО РАН
Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50

² Красноярский государственный медицинский университет (КрасГМУ) им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

³ Сибирский физико-технический институт Томского государственного университета (СФТИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пл. Новособорная, 1

РЕЗЮМЕ

Цель. Разработка и демонстрация метода одновременного определения нескольких биомаркеров рака легкого в плазме крови больных с помощью мультиплексной электрохимической сенсорной системы, основанной на ДНК-аптамерах. ДНК-аптамеры представляют собой новый класс синтетических аффинных реагентов, получаемых с помощью процедуры селекции *in vitro* или *in vivo* методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX).

Материалы и методы. Для создания мультиплексного электрохимического биочипа использовались несколько аптамеров, полученных ранее путем селекции к послеоперационным тканям рака легкого. Идентификацию белков-мишеней аптамеров проводили с помощью модифицированного метода аффинного обогащения (ArtaVID). В качестве молекулярных мишеней для использованного набора аптамеров к раку легкого были определены виментин, дефензин, легкая цепь миозина, тубулин альфа 1-В, нейтрофил эластаза и фактор удлинения 1 А1. Определение наличия этих белков-биомаркеров в плазме крови проводили с помощью электрохимической детекции. В качестве отклика системы на присутствие белков-онкомаркеров в плазме крови выступала разница между величинами пиков на квадратно-волновой вольтамперограмме до и после нанесения плазмы на электроды с предварительно иммобилизованными на их поверхности аптамерами. Для контрольного сравнения использовалась плазма крови здоровых добровольцев.

Результаты. Показано, что в плазме крови всех исследованных больных раком легкого повышено содержание белков-биомаркеров, связывающихся с аптамерами на поверхностях электродов. Повышенное содержание этих белков в плазме крови больных предполагает их химиорезистентность и высокую степень инвазивности и метастазирования опухолей.

Ключевые слова: аптамеры, биомаркеры, рак легкого, мультиплексная электрохимическая сенсорная система.

✉ Замай Татьяна Николаевна, e-mail: tzamay@yandex.

ВВЕДЕНИЕ

Среди всех форм злокачественных новообразований одним из наиболее распространенных является рак легкого, составляющий около четверти всех смертей от рака. Для снижения смертности от этого заболевания требуется адекватная оценка состояния опухолевого процесса. Однако оценить степень злокачественности опухоли и ее гетерогенности невозможно без биопсии опухолевой ткани, что не всегда представляется возможным из-за высокой степени инвазивности этой процедуры.

Альтернативой тканевой биопсии является жидкостная биопсия, позволяющая оценить содержание в крови продуктов распада опухоли, в том числе белков-биомаркеров. Однако до настоящего времени не найдено ни одного маркера онкологического заболевания, имеющего 100%-ю чувствительность и специфичность. При этом иногда у людей, не страдающих онкологическими заболеваниями, выявляется такое количество биомаркеров, которое характерно для онкологических заболеваний. В частности, раково-эмбриональный антиген СЕА и цитокератины CYFRA21-1, которые часто используются для диагностики рака легкого, у больных могут колебаться в очень широких пределах. Например, у больных раком легкого концентрация СЕА изменяется от 0,6 до 588 нг/мл, тогда как у здоровых людей она составляет в среднем около 5 нг/мл [1], а концентрация CYFRA21-1 – 1,3–5,7 нг/мл [2–4], в то время как у здоровых людей – 0,5–3,3 нг/мл [1, 2]. Поэтому для диагностики онкологических заболеваний становится более актуальным определение сочетания белков-биомаркеров.

Необходимое для оценки опухолевой прогрессии одновременное определение нескольких белков – сложная задача, поэтому при диагностике обычно оценивают наличие в крови не более одного-двух белков-биомаркеров, которые традиционно выявляют с применением моноклональных антител. В последнее время все чаще в качестве средств диагностики стали применять аптамеры, представляющие собой новый класс синтетических аффинных реагентов на основе олигонуклеотидов, получаемых с помощью процедуры селекции *in vitro* или *in vivo* методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX).

По своей химической природе аптамеры представляют собой короткие одноцепочечные фрагменты ДНК либо РНК, формирующие трехмерные структуры и связывающиеся с лигандами за

счет комплементарных взаимодействий. Благодаря своей уникальной конформации, аптамеры могут связываться с любыми биологическими мишенями, что создает основу для разработки эффективных диагностических средств. Кроме того, аптамеры термостабильны, при потере аффинности их свойства могут быть легко восстановлены, аптамеры можно химически синтезировать и модифицировать, что позволяет использовать их в различных целях.

В работе представлен мультиплексный электрохимический биочип на основе ДНК-аптамеров, позволяющий одновременно определять панель из шести белков-биомаркеров в плазме крови больных раком легкого для оценки развития опухоли и степени ее злокачественности. Для создания мультиплексного электрохимического биочипа использовались аптамеры, полученные ранее к послеоперационным тканям рака легкого [5, 6]. Идентификацию белков-мишеней аптамеров проводили с помощью модифицированного метода аффинного обогащения с использованием аптамеров (AptaVID) [5–7]. Целью работы являлась демонстрация возможности применения мультиплексного электрохимического биосенсора на основе ДНК-аптамеров, специфичных к белкам-биомаркерам, для определения панели из шести белков-биомаркеров рака легкого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мультиплексные электрохимические чипы были получены по технологии изготовления печатных плат с финишным иммерсионным золотым покрытием (АО «Электроконнект», г. Новосибирск). Мультиплексный электрохимический чип имел шесть измерительных электродов, на поверхности которых иммобилизованы шесть различных аптамеров, каждый к своему белку-биомаркеру, и два резервных электрода. Мультиплексный электрохимический чип представлял собой систему трехслойных электродов на основе меди, никеля, золота с линейными размерами около 11 × 35 мм, нанесенных на поверхность из текстолита, применяемого для изготовления печатных плат в микроэлектронике. Сверху, за исключением рабочих поверхностей электродов, контактирующих с исследуемой плазмой крови, все было покрыто электроизолирующим слоем лака.

Мультиплексный чип модифицировали посредством иммобилизации на золотую поверхность измерительных электродов шести аптамеров – LC-17, LC-18, LC-29, LC-2107, LC-2108, LC-2114 (рис. 1).

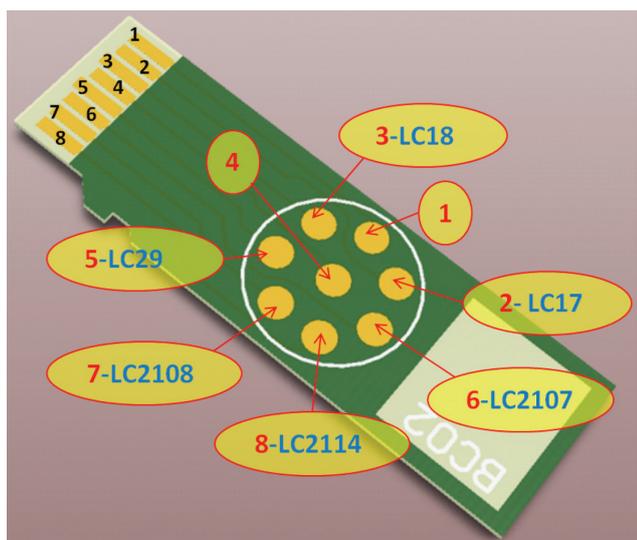


Рис. 1. Мультиплексный электрохимический биосенсор, схема модификации электродов аптамерами и порядок их электрического соединения с контактами: 1, 4 – резервные электроды

Fig. 1. Multiplex electrochemical biosensor, scheme of the electrode modification by aptamers and the order of their electrical connection with contacts: 1, 4 – backup electrodes

Связывание аптамеров с золотой поверхностью электродов осуществляли с помощью тиоловых групп. Модифицированные тиоловыми группами аптамеры приобретались в фирме Integrated DNA Technologies (США). Перед связыванием аптамеров тиоловые группы восстанавливали, поскольку в аптамерах они находились в окисленном состоянии. Процедура восстановления тиоловых групп состояла из нескольких этапов. Вначале 100 мкМ раствора аптамеров в фосфатном буфере смешивали с равным объемом 20 мМ водного раствора дитиотриэтола (ДТТ), после чего смесь инкубировали 1 ч и замораживали. Дитиотриэтол восстанавливал тиоловые группы. На следующем этапе аптамеры с восстановленными тиоловыми группами очищали от ДТТ, для чего 10 мкл раствора аптамеров с ДТТ переносили в центрифужную фильтр-пробирку 30К, добавляли 90 мкл фосфатного буфера и центрифугировали 30 мин при 5 тыс. об/мин.

Затем на фильтр наносили 100 мкл фосфатного буфера и центрифугировали еще 30 мин. Эту процедуру повторяли дважды для более полной очистки аптамеров от ДТТ. Для перевода аптамеров в раствор в пробирку добавляли 100 мкл фосфатного буфера, пипетировали и инкубировали 10 мин. Концентрацию ДНК-аптамеров в полученном растворе определяли спектрофото-

метрически. Концентрация ДНК-аптамеров обычно составляла 2,5 мкМ. Для получения рабочего раствора ДНК-аптамеров раствор разводили фосфатным буфером до концентрации 500 нМ. Для придания аптамерам нужной конформации раствор нагревали до 95 °С в течение 10 мин и затем быстро охлаждали на льду. После этих процедур ДНК-аптамеры были готовы для нанесения на золотую поверхность.

Связывание аптамеров с электродами проходило в нескольких этапах. Электроды обрабатывались в течение 5 мин раствором Пиранья (смесь концентрированной серной кислоты и 30% раствора перекиси водорода в соотношении 3 : 1). Затем электроды промывали водой и перекладывали в чашку Петри с уложенной на дне мокрой салфеткой, после чего электроды высушивали потоком азота. Затем на каждый измерительный электрод капали по 15 мкл аптамеров (на 2-й электрод – аптамер LC17, на 3-й электрод – LC18, на 5-й электрод – LC29, на 6-й электрод – LC2107, на 7-й электрод – LC2108, на 8-й электрод – LC2114), чашку закрывали, обматывали парафильмом и оставляли на 12 ч при температуре 4 °С. Через 12 ч электроды промывали деионизированной водой, а на измерительные электроды наносили 15 мкл 5 мМ 2-меркаптоэтанола и инкубировали 15 мин при комнатной температуре, после чего промывали 40%-м этиловым спиртом и деионизированной водой и наносили фосфатный буфер. В результате получали электроды, покрытые аптамерами, специфичными к белкам-биомаркерам рака легких.

Для электрохимического определения белков-биомаркеров рака легкого в плазме крови использовалась кровь пациентов с верифицированным диагнозом «рак легкого». Для контроля использовалась плазма крови условно здоровых доноров, подходящих к экспериментальной группе по возрасту и не имеющих видимых симптомов заболеваний.

Измерения содержания белков-биомаркеров в плазме крови проводили с помощью электрохимической станции СН-600 (СН Instruments, США). Использовалась трехэлектродная ячейка с платиновым вспомогательным электродом (ВЭ) и хлорид-серебряным электродом сравнения (ЭС). Измерения проводились в окислительно-восстановительном буфере, содержащем 20 мМ Трис-ClO₄ (pH 8,6), 2,5 мМ K₄Fe(CN)₆ и 2,5 мМ K₃Fe(CN)₆. В качестве отклика системы на присутствие белков-онкомаркеров выступала разница между величинами пиков на квадратно-волновой вольтамперограмме для покрытых

аптамерами электродов до и после нанесения на них плазмы крови здорового или больного человека. Все измерения проводились три раза, после

чего результаты усреднялись. Схема подготовки образца, его измерения и анализа представлены на рис. 2.

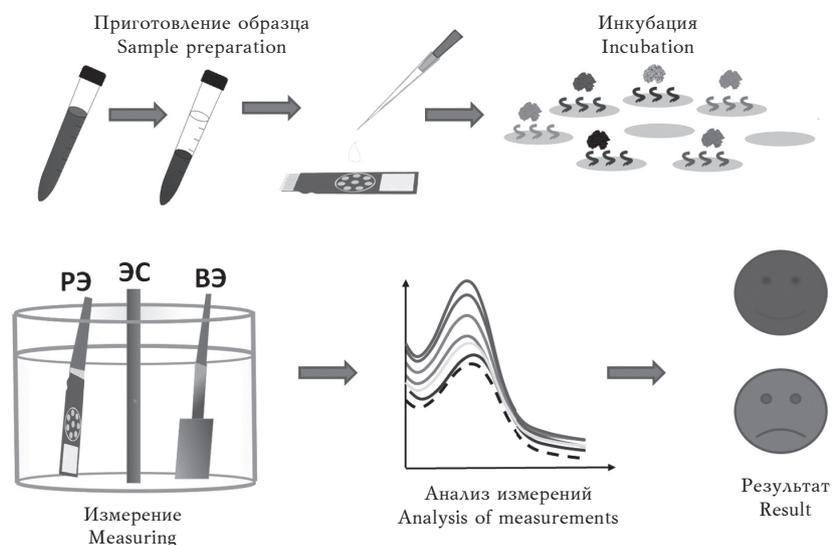


Рис. 2. Схема подготовки образца крови, его нанесения на мультиплексный биосенсор, измерения и анализа: РЭ – рабочий электрод, ВЭ – вспомогательный электрод, ЭС – электрод сравнения

Fig. 2. The scheme for preparing a blood sample, applying it to a multiplex biosensor, measuring and analyzing: РЭ – exploring electrode, ВЭ – auxiliary electrode, ЭС – reference electrode

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью мультиплексного биочипа на основе аптамеров была исследована плазма крови трех условно здоровых людей и трех больных раком легкого (двое – больные плоскоклеточным раком легкого и один больной аденокарциномой легкого). Графики средних значений разницы между величиной пика на квадратно-волновой вольтамперограмме на электроде при определении белков-биомаркеров рака легкого в плазме крови здорового и больного плоскоклеточным раком легкого показаны на рис. 3. Анализ графиков показывает различие в поведении вольтамперных характеристик в случаях с плазмой крови больного и здорового человека. Причем это было характерным для всех шести исследованных аптамеров, что означает их потенциальную пригодность для уверенной детекции отличия плазмы крови здорового и больного человека.

Из графиков видно, что в плазме крови больного раком легкого по сравнению со здоровым повышено содержание белков-мишеней аптамеров LC-17, LC-18, LC-29, LC-2107, LC-2108, LC-2114, а именно виментина, нейтрофил дефензина, фактора удлинения 1, легкой цепи миозина, тубулина альфа 1-В, нейтрофил эластазы. Такая же картина наблюдалась и при определении бел-

ков-биомаркеров рака легкого у других больных (рис. 4).

Таким образом, продемонстрирована возможность одновременного определения методом электрохимии в одной пробе нескольких белковых маркеров, связанных с патологическими процессами разного характера, протекающими во время развития опухоли. Полученные при использовании мультиплексного биочипа данные позволяют охарактеризовать опухолевую ткань легкого и оценить уровень ее злокачественности. В частности, повышение содержания виментина, известного белка-онкомаркера онкологических заболеваний, в том числе рака легкого [8–10], является индикатором негативного прогноза при раке легкого [11], поскольку экспрессия виментина повышена в миграционных эпителиальных клетках и может вносить вклад в формирование инвазивных фенотипов метастатических клеток [12].

Повышенный уровень дефензинов вызывает усиление экспрессии цитокинов и хемокиновых рецепторов, стимулирует пролиферацию опухолевых клеток. Концентрация нейтрофил дефензина в плазме повышается при раке легких [13].

Эукариотический фактор удлинения 1 играет важную роль в белковом биосинтезе, связывает аминоксил-тРНК и передает его в А-сайт рибосомы.

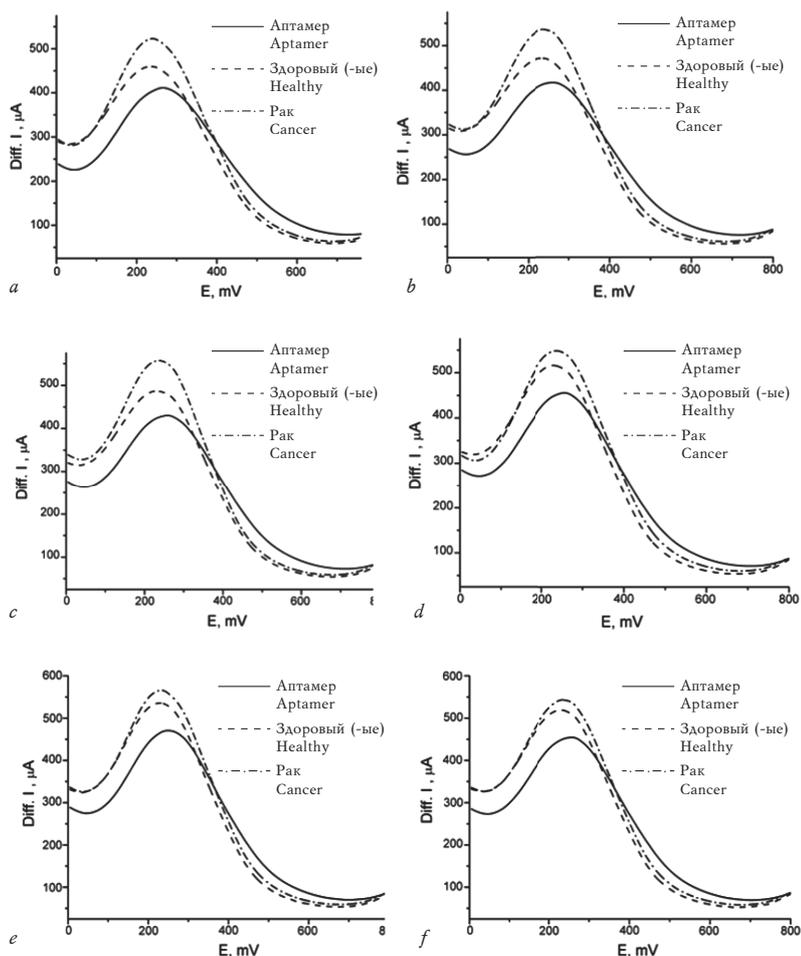


Рис. 3. Результаты измерений квадратно-волновой вольтамперометрии на восьми-электродных чипах с золотой поверхностью, функционализированных аптамерами: *a* – LC-17, *b* – LC-18, *c* – LC-29, *d* – LC-2107, *e* – LC-2108, *f* – LC-2114

Fig. 3. The results of measurements of square wave voltammetry on eight-electrode chips with a gold surface, functionalized by aptamers: *a* – LC-17, *b* – LC-18, *c* – LC-29, *d* – LC-2107, *e* – LC-2108, *f* – LC-2114

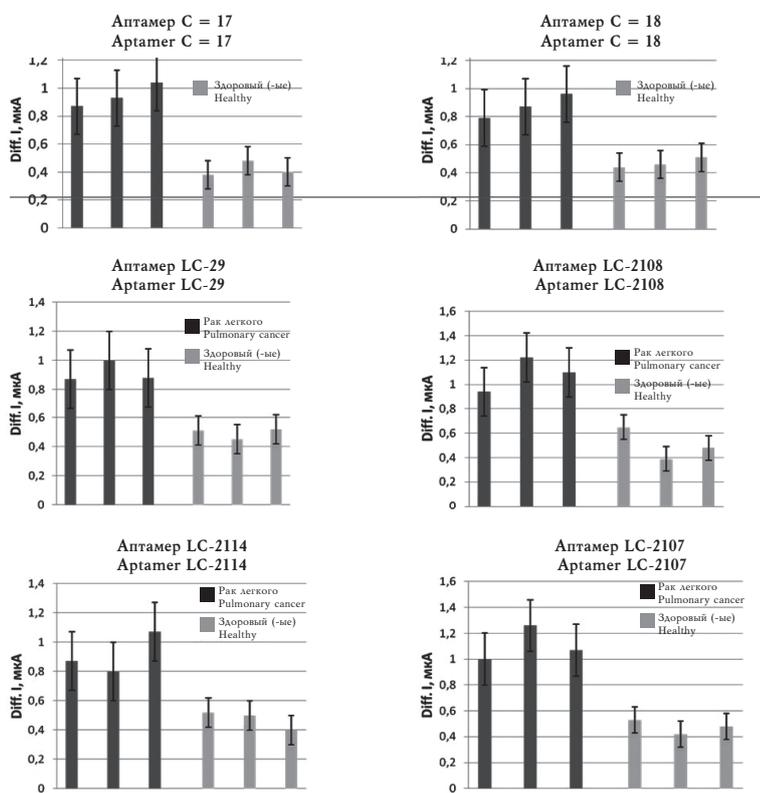


Рис. 4. Изменение электрохимических показателей (мкА) мультиплексных биосенсоров на основе ДНК-аптамеров под влиянием белков-биомаркеров рака легкого у здоровых людей и больных раком легкого, измеренных с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии

Fig. 4. The change in electrochemical parameters (μA) of multiplex biosensors based on DNA-aptamers under the influence of protein-biomarkers of lung cancer in healthy people and lung cancer patients measured with square wave voltammetry

Повышение его экспрессии обнаружено при процессах трансформации клеток, канцерогенезе и клеточной гибели [14], выявлена его протоонкогенная природа при раке яичников, молочной железы, поджелудочной железы и печени [15–17]. Кроме того, показано, что фактор удлинения 1 A1 взаимодействует с белками семейства p53, которые играют ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации и гибели. Повышенная экспрессия фактора удлинения 1 A1 специфически ингибирует p53- и p73-индуцированный апоптоз при химиотерапии, что приводит к возникновению химиорезистентности [18].

Легкая цепь миозина также играет важную роль в клеточной миграции и метастазировании. Некоторые мутации этого белка связаны с развитием рака, поскольку он вовлечен в процессы клеточной адгезии, миграции и мембранного блеббинга. Выяснено, что уровень экспрессии легкой цепи миозина как регулятора цитоскелета коррелирует с рецидивами и метастазированием при немелкоклеточном раке легкого [19].

Кроме того, в активации пролиферации, формировании цитоскелетных волокон, позиционировании ядра, клеточной подвижности, модификации цитоскелета, формировании органелл важную роль играют белки цитоскелета, в том числе тубулин [20]. Видимо, именно с этим связано повышенное количество тубулина в некоторых культурах клеток аденокарциномы легкого, резистентных к противораковым лекарствам [21].

Нейтрофил эластаза изменяет функции естественных клеток-киллеров, моноцитов и гранулоцитов. Дисбаланс между нейтрофил эластазой и $\alpha 1$ -антитрипсином является основополагающим фактором в разрушении ткани легкого, что создает благоприятную среду для развития канцерогенеза. Нейтрофил эластаза имеет широкую субстратную специфичность к таким структурам, как цитокины, рецепторы цитокинов и интегринов, компоненты внеклеточного матрикса, в том числе эластические волокна [22]. В одном из исследований, проведенных на клеточных культурах аденокарциномы легкого, показано, что нейтрофил эластаза способствует росту опухоли. Добавление умеренного количества нейтрофил эластазы к клеткам приводило к увеличению пролиферации, а добавление высокого количества – к гибели клеток [23]. Нейтрофил эластаза играет главную роль в развитии хронических обструктивных легочных болезней и вовлечена в развитие немелкоклеточного рака легких. Действие нейтрофил эластазы проявляется на нескольких уровнях: внутриклеточном, внеклеточном и во внеклеточном матрик-

се. Во внеклеточном матриксе она стимулирует рост эластических волокон, которые участвуют в ангиогенезе и инвазии опухоли.

Повышенный уровень белков-биомаркеров в плазме крови исследованных больных раком легкого свидетельствует о высокой вероятности у этих больных метастазирования опухоли, поскольку в клетках активированы процессы пролиферации опухолевых клеток (высокий уровень дефензина), индуцированы процессы клеточной миграции и опухолевой инвазии (высокий уровень виментина, легкой цепи миозина, тубулина альфа 1-В и нейтрофил эластазы) и подавлены процессы p53- и p73-индуцированного апоптоза (высокий уровень фактора удлинения 1 A1), что может свидетельствовать о химиорезистентности опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты проиллюстрировали способность мультиплексной электрохимической тест-системы с одновременным использованием нескольких ДНК-аптамеров выявлять в плазме крови повышенное содержание определенных белков, которые являются молекулярными мишенями аптамеров. Внедрение тест-системы подобного типа в диагностическую практику в перспективе позволит осуществлять одновременный скрининг нескольких основных белков-онкомаркеров и делать заключения об опухолевой прогрессии онкологических больных на основе жидкостной биопсии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Глазырин Ю.Е., Шабалина А.В. – разработка концепции, дизайна и исследовательские работы, анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение для публикации рукописи. Рыжинская К.А. – разработка концепции, дизайна и исследовательские работы, анализ и интерпретация данных. Замай С.С. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Коловский В.А. – разработка концепции, дизайна и исследовательские работы. Светличный В.А. – анализ и интерпретация данных. Лапин И.Н. – анализ и интерпретация данных. Замай Г.С. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Коловская О.С. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Замай Т.Н. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Пац Ю.С. – про-

верка критически важного интеллектуального содержания. Кичкайло А.С. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом КрасГМУ (решение № 37/2012 от 31.01.2012).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mumbarkar P., Raste A.S., Ghadge M.S. Significance of tumor markers in lung cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2006; 21 (1): 173–176. DOI: 10.1007/BF02913090.
- Wang R., Wang G., Zhang N., Li X., Liu Y. Clinical evaluation and cost-effectiveness analysis of serum tumor Markers in Lung Cancer. *BioMed Research International*. 2013; 2013: 1–7. DOI.org/10.1155/2013/195692.
- Mizuguchi S., Nishiyama N., Iwata T., Nishida T., Izumi N., Tsukioka T., Inoue K., Kameyama M., Suehiro S. Cytokeratin 19 fragment as predictive factors for recurrence in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 2007; 83 (1): 216–221.
- Bastawisy A.E., Elazzouny M., Mohammed G., Awadallah A., Behiry E. Serum cytokeratin 19 fragment in advanced lung cancer: could we eventually have a serum tumor marker? *Ecaner*. 2014; 8 (394): 1–9. DOI.org/10.3332/ecancer.2014.394.
- Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Glazyrin Yu.E., Krat A.V., Zubkova O.A., Spivak E.A., Wehbe M.B., Gargaun A.A., Muharemagic D.A., Komarova M.A., Grigorieva V.L., Savchenko A.A., Modestov A.A., Berezovski M.V., Zamay A.S. 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.
- Zamay G.S., Zamay T.N., Kolovskii V.A., Shabanov A.V., Glazyrin Yu.E., Veprintsev D.V., Krat A.V., Zamay S.S., Kolovskaya O.S., Gargaun A., Sokolov A.E., Modestov A.A., Artyukhov I.P., Chesnokov N.V., Petrova M.M., Berezovski M.V., Zamay A.S. Electrochemical aptasensor for lung cancer-related protein detection in crude blood plasma samples. *Scientific Reports*. 2016; 6: 343–350. DOI: 10.1038/srep34350.
- Berezovski M.V., Lechmann V., Musheev M.U., Mak T.W., Krylov S.N. Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBID). *Journal of American Chemical Society*. 2008; 130 (28): 9137–9143. DOI: 10.1021/ja801951p.
- Василенко И.В., Кондратюк Р.Б., Колесникова И.А., Кудряшов А.Г. Экспрессия виментина в опухолевых клетках раков различных органов и разного гистологического типа. *Патология*. 2014; 1 (30): 845–867.
- Hou J.-M., Krebs M., Ward T., Sloane R., Priest L., Hughes A., Clack G., Ranson M., Blackhall F., Dive C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *The American Journal of Pathology*. 2011; 178 (3): 989–996. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.003.
- Satelli A., Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol. Life Sci.* 2011; 68 (18): 3033–3046. DOI: 10.1007/s00018-011-0735-1.
- Al-Saad S., Al-Shibli K., Donnem T., Persson M., Bremnes R.M., Busund L.-T. The prognostic impact of NF- κ B p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. 2008; 99 (9): 1476–1483. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604713.
- Paterlini-Brechot P., Benali N.L. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Letters*. 2007; 253 (2): 180–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.014>.
- Arimura Y., Ashitani J.-I., Yanagi S., Tokojima M., Abe K., Mukae H., Nakazato M. Elevated serum-defensins concentrations in patients with lung cancer. *Anticancer Research*. 2004; 24: 4051–4058.
- Tomlinson V.A., Newbery H.J., Bergmann J.H., Boyd J., Scott D., Wray N.R., Sellar G.C., Gabra H., Graham A., Williams A.R., Abbott C.M. Expression of eEF1A2 is associated with clear cell histology in ovarian carcinomas: overexpression of the gene is not dependent on modifications at the EEF1A2 locus. *British J. Cancer*. 2007; 96 (10): 1613–1620. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603748.
- Pinke D.E., Kalloger E., Francetic T., Huntsman D.G., Lee J.M. The prognostic significance of elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008; 108 (3): 561–568. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.11.019.
- Cao H., Zhu Q., Huang J., Li B., Zhang S., Yao W., Zhang Y. Regulation and functional role of eEF1A2 in pancreatic carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 380 (1): 11–16. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.12.171.
- Li Z., Qi C.F., Shin D.M., Zingone A., Newbery H.J., Kovalchuk A.L., Abbott C.M., Morse H.C. Eef1a2 promotes cell growth, inhibits apoptosis and activates JAK/STAT and AKT signaling in mouse plasmacytomas. *PLoS One*. 2010; 5 (5): e10755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010755>.
- Blanch A., Robinson F., Watson I.R., Cheng L. S., Irwin M.S. Eukaryotic translation elongation factor 1-Alpha 1 inhibits p53 and p73 dependent apoptosis and chemotherapy sensitivity. *Plos One*. 2013; 8 (6): e66436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066436>.
- Kenzo K., Kaneko K., Satoh K., Masamune A., Satoh A., Shimosegawa T. Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*. 2002; 24 (1): 34–41.
- Joglekar A.P., Bloom K.S., Salmon E.D. Mechanisms of force generation by end-on kinetochore-microtu-

- bule attachments. *Current Opinion in Cell Biology*. 2010; 22 (1): 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.010>.
21. Martello L.A., Verdier-Pinard P., Shen H.-J., He L., Torres K., Orr G. A., Horwitz S. B. Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a taxol-resistant/dependent a549 cell line with an α -tubulin mutation. *Cancer Res. March*. 2003; 63: 1207.
22. Lee W.L., Downey G.P. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001; 164 (5): 896–904. DOI: 10.1164/ajrccm.164.5.2103040.
23. Houghton A.M., Rzymkiewicz D.M., Ji H., Gregory A.D., Egea E.E., Metz H.E. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat. Med*. 2010; 16 (2): 219–223. DOI: 10.1038/nm.2084.

Поступила в редакцию 20.11.2017

Подписана в печать 15.05.2018

Глазырин Юрий Евгеньевич, науч. сотрудник, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

Шабалина Анастасия Валерьевна, канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, СФТИ ТГУ, г. Томск.

Рыжинская Ксения Александровна, студент, СФТИ ТГУ, г. Томск.

Замай Сергей Сергеевич, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник, ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

Коловский Василий Андреевич, инженер, ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

Светличный Валерий Анатольевич, канд. физ.-мат. наук, зав. лабораторией перспективных материалов и технологий, СФТИ ТГУ, г. Томск.

Лапин Иван Николаевич, науч. сотрудник, СФТИ ТГУ, г. Томск.

Замай Галина Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

Коловская Ольга Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

Замай Татьяна Николаевна, д-р биол. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Пац Юрий Сергеевич, канд. мед. наук, профессор, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Кичкайло Анна Сергеевна, д-р биол. наук, руководитель лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

(✉) Замай Татьяна Николаевна, e-mail: tzamay@yandex.

УДК 616.24-006.6-074:577.29.085.25

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-13-21>

For citation: Glazyrin Yu.E., Shabalina A.V., Ryginskaya K.A., Zamay S.S., Kolovski V.A., Svetlichnyi V.A., Lapin I.N., Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Pac Yu.S., Kichkailo A.S. Screening of lung cancer biomarker-proteins with a multiplex electrochemical sensor system based on aptamers. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (3): 13–21.

Screening of lung cancer biomarker-proteins with a multiplex electrochemical sensor system based on aptamers

Glazyrin Yu.E.^{1,2}, Shabalina A.V.³, Ryginskaya K.A.³, Zamay S.S.¹,
Kolovski V.A.¹, Svetlichnyi V.A.³, Lapin I.N.³, Zamay G.S.^{1,2},
Kolovskaya O.S.^{1,2}, Zamay T.N.², Pac Yu.S.², Kichkailo A.S.^{1,2}

¹ Federal Research Center (FRC) of the KSC of the SB RAS
50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation

² Krasnoyarsk State Medical University (KrasSMU) named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky
1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

³ Siberian Physical-Technical Institute (SPbTI) of Tomsk State University (TSU)
1, Novosobornaya Sq., Tomsk, 634014, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this work is the development and demonstration of the method of simultaneous detection of several biomarkers of lung cancer in the blood plasma of patients using a multiplex electrochemical testing system based on DNA aptamers. DNA aptamers are a new class of synthetic affinity probes obtained by *in vitro* or *in vivo* selection procedure by the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX).

Materials and methods. A set of aptamers obtained previously by selection for postoperative lung cancer tissue was used to create a multiplex electrochemical biochip. Identification of aptamer target proteins was performed using a modified affinity enrichment method (AptaBID). Molecular targets for the used set of aptamers to lung cancer were defined as vimentin, defensin, a light chain of myosin, tubulin alpha 1-B, neutrophil elastase and A1 elongation factor 1.

Measurements of the presence of these biomarker proteins in blood plasma were carried out using electrochemical detection. The difference between peak heights before and after plasma deposition on the electrodes modified by aptamers was considered as a response of the system to the presence of protein onco-markers in blood plasma. Blood plasma of healthy volunteers was used as control.

Results. Research showed that in the blood plasma of all the patients with lung cancer the content of biomarker proteins that bind to aptamers on electrode surfaces was increased. The increased content of these proteins in the blood plasma of patients suggests the presence of invasiveness and metastasis of tumors and their chemo-resistance.

Key words: aptamers, biomarkers, lung cancer, multiplex electrochemical sensory system.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study approved by the local ethics committee under the KrasSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky (Protocol No. № 37/2012 of 31.01.2012).

Received 20.11.2017

Accepted 15.05.2018

Glazyrin Yury E., Researcher, KrasSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, FRC of the KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Shabalina Anastasia V., PhD, Researcher, SPhTI of TSU, Tomsk, Russian Federation.

Ryginskaya Ksenia A., Student, SPhTI of TSU, Tomsk, Russian Federation.

Zamay Sergey S., PhD, Researcher, FRC of the KSC of the SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Kolovski Vasilii A., Researcher, FRC of the KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Svetlichnyi Valerii A., PhD, Head of Laboratory of Advanced Materials and Technology, SPhTI of TSU, Tomsk, Russian Federation.

Lapin Ivan N., Researcher, SPhTI of TSU, Tomsk, Russian Federation.

Zamay Galina S., PhD, Researcher, FRC of the KSC SB RAS, KrasSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Kolovskaya Olga S., PhD, Researcher, FRC of the KSC SB RAS; KrasSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Zamay Tatiana N., DBSc, Professor, Leading Researcher, KrasSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Пас Юрий С., PhD, Professor, KrasSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Kichkailo Anna S., DBSc, Head of Laboratory BoMeT, KrasSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky; FIC of the KSC of the SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) **Zamay Tatiana N.**, e-mail: tzamay@yandex.