

## СЕЛЕКЦИЯ АПТАМЕРОВ *IN VIVO*, ПРОХОДЯЩИХ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР МОЗГА МЫШИ

Зубкова О.А., Спивак Е.А.

научный руководитель д-р биол. наук Замай Т.Н.

*Сибирский федеральный университет*

*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф.*

*Войно-Ясенецкого*

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – это комплексный физиологический механизм, находящийся в центральной нервной системе на границе между кровью и нервной тканью и регулирующий поступление из крови в цереброспинальную жидкость и нервную ткань циркулирующих в крови веществ [3].

**Актуальность.** Проблема регулирования проницаемости ГЭБ стоит очень остро. Наличие гематоэнцефалического барьера затрудняет лекарственную терапию большинства заболеваний головного мозга, а при некоторых заболеваниях, например, рассеянном склерозе, необходимо, напротив, снизить излишнюю проницаемость ГЭБ [4]. Использование новых подходов для регуляции проницаемости ГЭБ с помощью оц-ДНК аптамеров возможно позволит добиваться желаемых результатов лечения и избегать осложнений. Для достижения терапевтического эффекта возможно создание комплексов аптамеров с лекарственными веществами, кроме того сами аптамеры могут влиять на молекулу-мишень [1; 2].

**Целью работы** было получение пулов аптамеров, способных проникать через ГЭБ или специфично связываться с рецепторами ГЭБ для дальнейшей разработки технологии направленной доставки лекарственных веществ в головной мозг.

### **Задачи исследования:**

- а) провести селекцию аптамеров *in vivo* на животной модели;
- б) оценить специфичность и аффинность полученных аптамеров.

**Материалы и методы.** Селекцию аптамеров *in vivo* к тканям области желудочка, мозжечка и коры больших полушарий проводили с использованием оц-ДНК библиотеки N80. 0,1 нмоль библиотеки или пула аптамеров вводили мышам внутримышечно, через час у животного забирали головной мозг, из криосрезов которого выделяли области желудочков, мозжечка и коры больших полушарий. Находящиеся в выделенных участках головного мозга аптамеры амплифицировали с помощью симметричной и асимметричной полимеразной цепной реакции. Полученный пул аптамеров использовали для дальнейшей селекции. Таким образом, было проведено 8 раундов селекции.

Ход селекции аптамеров контролировали с помощью агарозного гель-электрофореза. Для детекции флуоресценции одноцепочечных ДНК, меченных Alexa488, использовали гель-документирующую систему GBOX/EF2-E.

Аффинность аптамеров к клеткам головного мозга мыши определяли на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter, USA). Для этого по описанной выше методике из головного мозга мыши выделялись ткани желудочков и мозжечка. Ткань помещалась в фосфатный буфер, измельчалась механически и центрифугировалась. К супернатанту, содержащему клетки ткани головного мозга, добавляли аптамеры с флуоресцентной меткой Alexa488. После инкубации в течение 30 минут при температуре 37,7°C оценивали аффинность аптамеров.

Способность прохождения аптамеров через ГЭБ оценивали по флуоресценции структур головного мозга мыши после внутримышечного введения аптамеров,

меченных флуоресцентным зондом Alexa488. Для этого путем транскардиальной перфузии (фосфатный буфер, 4% параформальдегид) фиксировали ГМ мыши, делали срезы мозга в медиальной и средней сагиттальной плоскостях. Флуоресценцию регистрировали на микроскопе Olympus CX-41.

Исследовали специфичность аптамеров с помощью микроскопии культур клеток нейрональной природы проинкубированных с пулом аптамеров 6 раунда секции. Клеточные культуры получали из стволовых клеток головного мозга эмбрионов мыши. Культивирование проводили в питательной среде DMEM с добавлением антибиотиков, факторов роста и 10% коровьей сыворотки. Флуоресценцию регистрировали на микроскопе Olympus CX-41.

**Результаты.** Всего было проведено 8 раундов селекции аптамеров. Наибольшей аффинностью обладает пул аптамеров 7 раунда селекции (Рисунок 1).

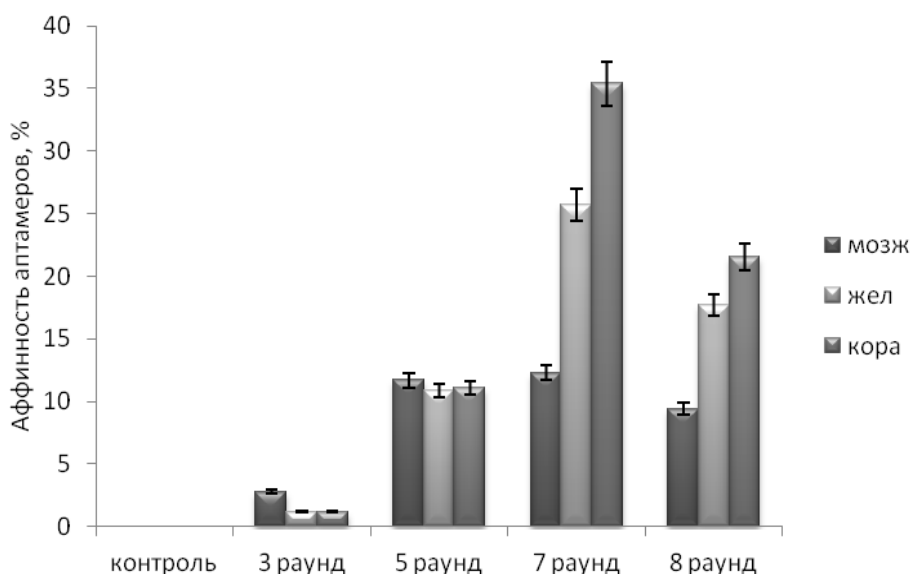


Рисунок 1 - Анализ аффинности пулов аптамеров разных раундов селекции к клеткам желудочков, мозжечка и коры головного мозга мышей с помощью проточной цитометрии.

Исследование способности прохождения аптамеров через ГЭБ показало, что наибольшая интенсивность флуоресценции при микроскопировании наблюдалась в области желудочков и мозжечка.

Аптамеры 7 раунда селекции показали специфичное связывание с культивированными клетками нейрональной природы.

**Выводы.** В ходе работы была проведена селекция аптамеров *in vivo* к участкам головного мозга мыши. Результаты исследований показали, что выбранные нами аптамеры способны проходить через ГЭБ и обладают высокой аффинностью к клеткам головного мозга, а в перспективе могут быть использованы для направленной доставки лекарственных веществ в ГМ.