

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Obecnie choroby cywilizacyjne stanowią duże wyzwanie dla dziedzin diagnostyki i farmakologii. Jednymi z najcięższych przypadłości są szeroko pojęte choroby nowotworowe. Obok nowotworów patologie układu krążenia jak np.: miażdżyca są również poważnym problemem klinicznym. W obu przypadkach istotne jest określenie czynników ryzyka, diagnoza choroby we wczesnym stadium i zastosowanie odpowiednio dobranej terapii. Dlatego też zasadne jest, iż poszukuje się zaawansowanych i precyzyjnych narzędzi diagnostycznych.

Okazuje się, że wykrywanie zaburzeń układu krzepnięcia może być czynnikiem prognostycznym zarówno dla rozwoju miażdżycy jak i dla chorób nowotworowych [13]. Trombina będąca kluczowym elementem układu krzepnięcia sprzyja rozwojowi powstającej blaszki miażdżycowej, zwiększa ryzyko incydentów zakrzepowo-zatorowych będących powikłaniem rozwijającej się miażdżycy. Może również stymulować proliferację komórek śródbłonna naczyniowego jak i komórek nowotworowych [13]. Sprzyja również wewnątrznaczyniowemu wykrzepianiu oraz interakcjom komórka nowotworowa-płytką krwi [14], [15]. Ponadto, może sprawiać, że komórki śródbłonna stają się czulsze na działanie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), co powoduje nasiloną mitozę komórek endothelium i ich migrację. Kolejnym dowodem na korelację dysfunkcji układu krzepnięcia z chorobami nowotworowymi jest występowanie u pacjentów onkologicznych żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej VTE (ang. *Venous Thromboembolism*) [3]. Jednym z identyfikowanych czynników ryzyka występowania VTE wśród pacjentów onkologicznych jest stan hiperkoagulacji, który wynika ze zwiększonej generacji trombin. Ważnym składnikiem układu krzepnięcia obok trombin jest czynnik von Willebranda, który aktywuje komórki śródbłonna sprzyjając rozwojowi zatorowości i przerzutów nowotworowych [5].

Dlatego opracowanie metody do badania funkcjonalnego stanu układu zakrzepowego jest istotne dla oceny stopnia rozwoju choroby nowotworowej jak i patologii układu krążenia. Proponowanym rozwiązaniem jest biosensor, którego możliwości detekcyjne opierają się na wykorzystaniu aptamerów. Aptamery to jednoniciowe syntetyczne oligonukleotydy, których niewątpliwą zaletą jest wysoka specyficzność i selektywność względem określonego ligandu [4]. Niewielkie rozmiary oligonukleotydów oraz ich jednoniciowa budowa, umożliwia im zmianę konformacji, co zapewnia ściśle łączenie się z epitopem docelowej cząsteczki. Dlatego też aptamery zyskują zainteresowanie na polach terapeutycznym i diagnostycznym. Jako narzędzia do opracowywania biosensorów stanowią konkurencję dla przeciwciał szeroko wykorzystywanych w metodach analiz jakościowych, ilościowych jak i terapiach przeciwnowotworowych. Aptamery mogą specyficznie wiązać np.: toksyny, antybiotyki, markery molekularne czy metale ciężkie [4]. Przykłady aptamerów skierowanych na trombinę i czynniki vWF, których wykorzystanie zaplanowano w projekcie, przedstawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Przykłady sekwencji aptamerów skierowanych na trombinę i czynnik vWF [1, 8, 10].

APTAMER	LIGAND	SEKWENCJA
HD1	Trombina	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'
HD22	Trombina	5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'
ARC1779	vWF	5'-GCGUGCAGUGCCUUCGGCCGTGCGGTGCCUCCGUCACGC-3'
ARC1772	vWF	5'-GGCGTGCAGTGCCTTCGGCCGTGCGGTGCCTCCGTCACGCC-3'

Dla zrealizowania nadrzędnego celu projektu konieczne jest zbadanie interakcji aptamer-białko. Ocenę tych oddziaływań można przeprowadzić wykorzystując metodę elektroforezy kapilarnej CE (ang. *Capillary Electrophoresis*). Technika ta pozwala na uzyskanie informacji na temat stałej dysocjacji kompleksu K_d aptamer-ligand i stałych szybkości procesu asocjacji (k_{on}) i dysocjacji (k_{off}) odpowiednio procesu tworzenia i rozpadu kompleksu. Otrzymane wartości pozwolą na ocenę przydatności wybranych aptamerów jako biomolekuł wychwytyjących i detekcyjnych w kontekście tworzonego biosensora, którego bazą są superparamagnetyczne mikrocząstki znakowane mieszaniną barwników fluorescencyjnych. Mikrocząstki wykorzystywane są w technologii Luminex opierającej się na detekcji kilku analitów w jednej próbce w jednym cyklu pomiarowym (technika multipleksu). Modyfikacja powierzchni mikrocząstek przez dołączenie grup tosyłowych prowadzi do jej aktywacji i pozwoli na opłaszczenie mikrosfer aptamerami na kolejnych etapach syntezy. Proces ten będzie kontrolowany dzięki wykorzystaniu metod spektroskopii ramanowskiej i cytometrii przepływowej FCM (ang. *Flow Cytometry*).