

новообразований. Выявлена прямая связь полиморфизмов гена MC1R со 2 и 3 фенотипом кожи, наличием базалиом кожи в анамнезе. В 30% случаев отмечалось прогрессирование заболевания у больных с наличием аллельного полиморфизма и резистентность к проводимому лечению.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о принципиальной возможности использования данного гена в качестве предиктора клинического течения меланомы кожи, а также для формирования групп повышенного онкологического риска.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 14-35-00107).

Литература

1. Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены // В кн: Канцерогенез / под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 125-156.
2. Модестов А.А., Сафонцев И.П., Зуков Р.А., Слепов Е.В., Клименок М.П., Гаас Е.Н. Онкологическая заболеваемость в Красноярском крае // Российский онкологический журнал. — 2016. — Т. 21, № 1-2. — С. 76-80.
3. Kennedy C., ter Huurne J., Berkhout M. et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color // J. Invest. Dermatol. — 2001. — Vol. 117, № 2. — P. 294-300.
4. Palmer J.S., Duffy D.L., Box N. F. et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype // Am. J. Hum. Genet. — 2000. — Vol. 66, № 1. — P. 176-186.
5. Williams P.F., Olsen C.M., Hayward N.K., Whiteman D. C. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden // Int. J. Cancer. — 2011. — Vol. 129, № 7. — P. 730-740

© КОМАРОВА М. А., НАРОДОВ А. А., ЕРАХТИН Е. Е., ЗАМАЙ Г. С., КИЧКАЙЛО А. С., КОЛОВСКАЯ О. С., БЕЛЯНИНА И. В., ВЕПРИНЦЕВ Д. В., ЗАМАЙ Т. Н.

УДК 577.29

СЕЛЕКЦИЯ АПТАМЕРОВ К ГЛИОБЛАСТОМЕ

М. А. Комарова, А. А. Народов, Е. Е. Ерахтин, Г. С. Замай, А. С. Кичкайло,
О. С. Коловская, И. В. Белянина, Д. В. Вепринцев, Т. Н. Замай
ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет
имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого.

Резюме. В работе описан способ селекции ДНК-аптамеров к глиоме головного мозга. В качестве мишени для селекции аптамеров использовали послеоперационную ткань людей с диагнозом глиома головного мозга. В качестве негативной мишени для селекции, а также для оценки специфичности и аффинности связывания полученных аптамеров к заданной мишени использовали послеоперационный материал опухолей неглиального происхождения — менингиомы и метастазов в головной мозг и опухолей различной локализации. Установлено, что полученные к глиоме головного мозга ДНК-аптамеры, обладают высокой специфичностью к опухолевой ткани.

Ключевые слова: глиома, ДНК-аптамеры, менингиома, метастазы.

SELECTION OF APTAMERS TO GLIOBLASTOMA

M. A. Komarova, A. A. Narodov, E. E. Erakhtin, G. S. Zamay, A. S. Kichkaylo,
O. S. Kolovskaya, I. V. Belyanina, D. V. Veprintsev, T. N. Zamay

Abstract. *The paper describes a method for the selection of DNA aptamers to brain glioma. The target for the selection of aptamers was postoperative tissue of people diagnosed with brain glioma. As a target for the negative selection and for assessment the specificity and binding affinity of aptamers to the target was used postoperative material of tumors non glial origin - meningioma and brain metastasis, and tumors of different localizations. It is found that the resulting brain glioma DNA aptamers have a high specificity for tumor tissue.*

Key words: *glioma, DNA aptamers, meningioma, metastases.*

Глиобластомы – первичные опухоли головного мозга, составляющие более 40% всех злокачественных новообразований центральной нервной системы. Выживаемость онкобольных с таким диагнозом редко превышает 12-15 месяцев [3]. Неблагоприятным является также прогноз выживаемости пациентов с метастазами солидных опухолей в головной мозг [2]. Глиомы головного мозга характеризуется значительной неоднородностью на клеточном, транскрипционном и геномном уровнях. Особенностью этих новообразований является инфильтративный рост и отсутствие четких границ. Часто встречаются терапевтически резистентные опухоли.

Для диагностики глиом головного мозга применяют компьютерную, магнитно-резонансную и позитронно-эмиссионную томографию [1]. Среди проблем нейровизуализации глиальных опухолей выделяют сложность определения их истинных границ. В частности, участки тканей, определяемые как отек белого вещества головного мозга, на самом деле зачастую представляют собой зону инфильтрации опухолевыми клетками. Таким образом, анализ данных литературы показал, что существующие методы диагностики глиом головного мозга обладают недостаточно высокой степенью специфичности и чувствительности. Поэтому, несмотря на разнообразие существующих методов

диагностики, основная масса больных выявляется на поздних стадиях, когда исход лечения уже неблагоприятен, в то время как для проведения эффективного лечения и увеличения выживаемости пациентов необходима ранняя и своевременная диагностика раковых опухолей.

В настоящее время традиционные диагностические и терапевтические препараты все чаще начинают замещаться средствами, получаемыми с помощью современных биотехнологий. Особую популярность приобретают средства диагностики и терапии на основе аптамеров. Аптамеры – синтетические одонитевые молекулы РНК или ДНК (размером 30-80 нуклеотидов), способные к специфичному связыванию с любыми молекулярными и клеточными мишенями: белками, малыми органическими молекулами, вирусными частицами, бактериями, антителами, целыми клетками, клеточными лизатами и даже тканями. Аптамеры получают с использованием технологии SELEX.

В качестве мишени для селекции аптамеров использовали послеоперационную ткань людей с диагнозом глиома головного мозга. В качестве негативной мишени для селекции, а также для оценки специфичности и аффинности связывания полученных аптамеров к заданной мишени использовали послеоперационный материал

опухолей неглиального происхождения – менингиомы и метастазов в головной мозг и опухолей различной локализации. Послеоперационный материал был предоставлен КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича». Все исследования выполнены в строгом соответствии с документами, регламентирующими этические нормы проведения исследований с использованием биологического материала человеческого происхождения (решение Локального этического комитета КрасГМУ № 37/2012 от 31.01.2012, решение Локального этического комитета КККОД № 8/2011 от 16.03.2011). Получение аптамеров к ткани глиомы головного мозга человека осуществляли методом *cell-SELEX* путем чередования позитивной и негативной селекции. В качестве позитивной мишени использовали опухолевую ткань глиомы головного мозга человека. В качестве негативных мишеней использовали послеоперационные ткани менингиомы и метастазов в мозг опухолей различной локализации. Наличие и размер одноцепочечной ДНК в ПЦР-продукте контролировали с помощью горизонтального электрофореза в 3%-ном агарозном геле после каждого раунда селекции. Пул аптамеров, наиболее селективно связывающийся с клетками глиомы головного мозга человека, был секвенирован в McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Канада). Синтез ДНК по полученным последовательностям был осуществлен фирмой IVA GmbH (Германия). Для выбора наиболее аффинных аптамеров, полученных в результате синтеза, использовали ткань глиомы головного мозга человека, полученную в результате оперативного удаления опухоли у онкологических больных. Для определения специфичности синтетических аптамеров использовали ткани менингиомы, метастазов опухолей различных локализаций в головной мозг. Для регистрации связывания аптамеров с клетками-мишенями на

проточном цитометре синтетические аптамеры, подобранные к глиоме, метили флуоресцентной меткой FAM.

Для получения ДНК-аптамеров к клеткам глиомы головного мозга человека была выбрана технология *cell-SELEX*, которая заключается в чередовании позитивной и негативной селекции. Данный метод позволяет выбрать наиболее специфичные аптамеры для ткани глиомы и исключить последовательности, способные связываться с другими типами опухолей головного мозга. Преимуществом метода селекции к ткани является то, что аптамеры подбираются к своим мишеням в конформации, максимально приближенной к естественной, в отличие от селекции аптамеров к очищенным белкам.

Исследования связывания аптамеров с клетками глиомы головного мозга человека показали, что наибольшим сродством к клеткам глиомы обладает пул аптамеров, полученный в ходе 5-го раунда селекции. В результате секвенирования пула аптамеров 5 раунда селекции были получены 20036 различных последовательностей с разными частотами встречаемости в пуле. Полученные последовательности были проанализированы с помощью математических методов, охарактеризованы и сгруппированы по семействам, исходя из степени близости. Для оценки степени близости двух аптамеров одинаковой длины использовали расстояние Хэмминга.

Специфичность аптамеров к глиобластоме оценивали с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Данные, полученные методом проточной цитометрии, показали, что наибольшим сродством к клеткам глиомы головного мозга обладают аптамеры – родоначальники семейств, при достаточно высоких показателях связывания с клетками они практически не связываются со здоровыми клетками мозга и другими типами опухолей головного мозга. Анализ

специфичности показал, что процент связывания аптамеров с клетками негативных мишеней выше по сравнению с негативными мишенями и библиотекой, но ниже по сравнению со связыванием аптамеров с клетками глиомы. Таким образом, полученные синтетические аптамеры к глиоме имеют слабое сродство к клеткам менингиомы и метастазов в мозг опухолей различной локализации и высокое сродство к клеткам глиобластомы. Анализ специфичности аптамеров к глиобластоме с помощью конфокальной микроскопии подтвердил данные проточной цитометрии о наличии сродства полученных синтетических аптамеров к своей мишени.

Таким образом, полученные к глиобластоме ДНК-аптамеры, обладающие высокой специфичностью к опухолевой ткани, в дальнейшей

работе будут использованы для создания средств диагностики и терапии.

Литература

1. Олюшин В.Е. Глиальные опухоли головного мозга: краткий обзор литературы и протокол лечения больных // Нейрохирургия. – 2005. – № 4. – С. 41-47.
2. Chiou S.M. Survival of brain metastasis patients treated with gamma knife surgery alone // Clin. neurolneurosurg. – 2013. – Vol. 115, № 3. – P. 260-265.
3. Schrand B. Targeting 4-1BB costimulation to the tumor stroma with bispecific aptamer conjugates enhances the therapeutic index of tumor immunotherapy // Cancer Immunology Research. – 2014. – Vol. 2, № 9. – P. 867-877.

© КРАТ А. В., ЗАМАЙ Т. Н., ЗАМАЙ Г. С., КОЛОВСКАЯ О. С., ГРИГОРЬЕВА В. Л., КИЧКАЙЛО А. С., ЗУКОВ Р. А.
УДК 616-006.6

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-АПТАМЕРОВ В ОЦЕНКЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

А. В. Крат², Т. Н. Замай¹, Г. С. Замай¹, О. С. Коловская¹, В. Л. Григорьева¹, А. С. Кичкайло¹, Р. А. Зуков^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого,

²КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского».

Резюме. Разработан метод окрашивания гистологических срезов рака легких с помощью аптамеров. Разработан метод выявления циркулирующих опухолевых клеток, циркулирующих опухолевых микроэмболов и апоптотических телец в крови больных. Показано, что чувствительность, специфичность и диагностическая точность выявления рака легкого с помощью аптамеров LC-17, LC-2114, LC-224, LC-29, LC-2107, LC-2108 с использованием флуоресцентной микроскопии легких составили 78,95%, 82,35% и 80,56%, соответственно. Содержание циркулирующих опухолевых клеток и их производных в крови больных раком легкого зависит от распространенности опухолевого процесса. Разработан метод визуализации злокачественных очагов в макропрепарате легкого после оперативного вмешательства с использованием хирургического флуоресцентного микроскопа.

Ключевые слова: рак легких, аптамеры, диагностика, циркулирующие опухолевые клетки, гистологические срезы, хирургия.