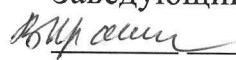


Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой


подпись инициалы, фамилия


«20» июня 2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

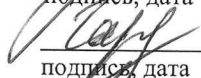
**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ГЛИОМЫ С ПОМОЩЬЮ
АПТАМЕРОВ**

06.04.01 Биология
06.04.01.03 Биофизика

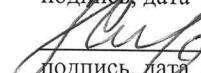
Научный руководитель

 проф. д.б.ч. Э.Н. Замосил
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент

 проф. д.б.ч. А.А. Нардуб
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Магистерская работа по теме «Разработка метода диагностики глиомы с помощью аптамеров» содержит 39 страниц текстового документа, 19 иллюстраций, 40 использованных источников.

ГЛИОБЛАСТОМА, АПТАМЕРЫ, ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ, ГИСТОЛОГИЯ, ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ.

Объект исследования – кровь и ткань пациентов с глиобластомой головного мозга

Цель данной работы: Разработать методы диагностики глиальных опухолей с помощью аптамеров.

Исходя из цели, были сформулированы следующие задачи:

1. С помощью аптамеров определить наличие циркулирующих опухолевых клеток в крови больных глиальными опухолями.
2. Оценить способность аптамеров выявлять биомаркеры глиомы в опухолевых тканях.
3. Оценить возможность использования ДНК-аптамеров, меченных флуоресцентной меткой, для выявления опухолевых очагов на макропрепарате опухоли.

В результате проведенного исследования была оценена способность ДНК-аптамеров выявлять опухолеспецифичные биомаркеры на гистологических срезах глиальных опухолей мозга человека и возможность использования их для разработки метода дифференциальной диагностики. Показано, что ДНК-аптамеры к глиальным опухолям мозга, меченные флуоресцентной меткой, могут быть использованы для выявления очагов и оценки границ опухоли при хирургическом лечении, что позволяет снизить риск рецидива заболевания. Исследована способность ДНК-аптамеров выявлять циркулирующие опухолевые клетки и их производные (циркулирующие микроэмболы и апоптотические тельца) в крови больных с глиомой и возможность их использования для разработки метода ранней диагностики.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Основная часть	6
1.1.1 Классификация	6
1.1.2 Канцерогенез опухолей головного мозга	9
1.1 Современная диагностика и методы лечения	12
1.2 Циркулирующие опухолевые клетки.....	14
1.3 Аптамеры	15
2 Материалы и методы	17
2.1 Объекты исследования	17
2.2 Методика изготовления гистологических криосрезов с помощью аптамеров	17
2.3 Методика изготовления гистологических парафиновых срезов с помощью аптамеров.....	19
2.4 Методика выделения циркулирующих опухолевых клеток из периферической крови больных, с помощью аптамеров и магнитных наночастиц.	20
2.5 Метод интраоперационной визуализации глиобластомы головного мозга	22
2.6 Метод проточной цитометрии.....	22
3. Результаты и их обсуждение.....	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	40

ВВЕДЕНИЕ

Глиальные опухоли головного мозга составляют около 40% всех опухолей ЦНС. Заболеваемость злокачественными глиомами составляет 5 – 8 случаев на 100 тысяч населения. Глиобластома является наиболее распространенной и высоколетальной первичной опухолью мозга. Частота выявления составляет примерно 12 – 16% среди всех внутричерепных новообразований, 40% от всех первичных опухолей головного мозга и 80% от первичных новообразований центральной нервной системы с высокой степенью злокачественности. Средняя продолжительность жизни больных составляет до 1 года – 68,1%, до 2 лет — 23,7%, до 3 лет — 4,3% [1, 2]. Также высока частота рецидивирования опухоли. Сложившаяся ситуация диктует необходимость поиска и создания новых, технологий ранней диагностики, мониторинга и лечения пациентов.

В последнее время из методов комплексной терапии злокачественных глиом все больше внимание привлекает разработка способов специфической противоопухолевой терапии и диагностики на основе аптамеров. Аптамеры – одноцепочечные ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, которые благодаря своей уникальной пространственной конформации имеют высокую специфичность и сродство к заданным мишеням [3]. Одним из методов с их использованием является аптагистохимия – это одна из самых современных методик дифференциальной диагностики онкологических заболеваний, позволяющая определить гистогенез опухоли на клеточном уровне и обнаружить связанные с опухолью биомаркеры, что незаменимо для подтверждения степени злокачественного перерождения опухоли.

Среди проблем также выделяют трудности нейровизуализации глиальных опухолей, а именно сложность определения их истинных границ, так как велика частота рецидива из-за оставшихся опухолевых клеток в инфильтративной зоне. Анализ данных литературы показал, что существующие методы диагностики

глиом головного мозга обладают недостаточно высокой степенью специфичности и чувствительности, поэтому необходимы новые методики.

В настоящее время в клинической практике диагноз опухоли мозга ставится на основании жалоб пациентов и зачастую обнаруживается на последних стадиях. Лучевые методы диагностики дороги, и требуют соблюдения определенного технического регламента, поэтому для достижения высоких показателей ранней диагностики их целесообразно дополнять методами с использованием чувствительных биомаркеров. В связи с этим, поиск новых чувствительных и специфичных опухолеассоциированных белков-биомаркеров крайне необходим для решения проблемы ранней диагностики глиобластомы.

Цель работы:

Разработать методы диагностики глиальных опухолей с помощью аптамеров.

Задачи:

1. С помощью аптамеров определить наличие циркулирующих опухолевых клеток в крови больных глиальными опухолями.
2. Оценить способность аптамеров выявлять биомаркеры глиомы в опухолевых тканях.
3. Оценить возможность использования ДНК-аптамеров, меченных флуоресцентной меткой, для выявления опухолевых очагов на макропрепарате опухоли

Работа выполнена в «Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий» в Красноярском государственном медицинском университете имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

1 Основная часть

1.1 Глиальные опухоли головного мозга

Центральная нервная система (ЦНС) человека образована нервной тканью, состоящей из нейронов, которые обрабатывают, хранят и передают информацию, и нейроглии, выполняющей трофическую и секреторную функции и создающей микроокружение нервных клеток [4]. Нервные клетки в зрелом состоянии лишаются способности к делению, клетки нейроглии обладают большими пролиферативными способностями и при возникновении мутации могут образовывать неоднородные скопления клеток с поврежденным и неконтролируемым делением. Таким образом, большинство опухолей ЦНС имеют глиальное происхождение.

1.1.1 Классификация

Глиомы представляют собой гетерогенную группу опухолей нейроэпителиального происхождения и являются самыми распространёнными первичными новообразованиями головного мозга. Они развиваются из клеток нейроглии и называются в соответствии с тем типом клеток, от которых произошли [5, 6]. К основным опухолям относятся астроцитарные (астроцитомы, анапластическая астроцитомы, глиобластомы), олигодендроглиальные, эпендимальные и опухоли смешанного типа [7].

Глиобластома является наиболее распространённой, на её счет приходится около 40% от всех глиальных опухолей головного мозга. В выживаемости пациентов важным фактором является максимально возможная и наиболее ранняя степень резекции [1, 8].

Гистологическими критериями глиом высоких степеней злокачественности являются гиперклеточность, клеточный плеоморфизм, выраженная митотическая

активность, ядерная атипия, эндотелиальная пролиферация, некроз и инфильтрация клеток в нормальную паренхиму мозга. В соответствии с системой оценки ВОЗ, именно некроз и/или пролиферация микрососудов (ангиогенез) в пределах опухоли являются характерными особенностями глиобластомы [9, 10].

Глиобластома является плотноклеточной, плохо дифференцированной опухолью, которая состоит из плеоморфных астроцитарных элементов. Отдельные клетки могут сильно варьироваться по форме и размеру, включая клетки с гранулированной цитоплазмой, многоядерные гигантские клетки, мелкие клетки с плотными ядрами и клетки, имеющие обильную эозинофильную цитоплазму (гемистоциты) [11, 12]. Не являются редкостью в структуре глиобластомы области, состоящие из слабо плеоморфных астроцитов, характерных для менее злокачественных астроцитом, что является типичным признаком опухолей, прогрессирующих из диффузной астроцитомы (II степень злокачественности). В некоторых наблюдаются очаги, напоминающие олигодендроглиому.

Периферия опухоли характеризуется наличием инфильтрирующих клеток, пронизывающих участки белого вещества, и отличающихся от нормальной клеточной паренхимы мозга [10]. Благодаря этому не наблюдается четкого разграничения между нормальной тканью мозга и опухолевой тканью.

Как правило, область некроза находится в центре опухоли, в то время как жизнеспособная опухоль с повышенной пролиферацией микрососудов смещена к периферии. Тем не менее, разрозненные очаги некроза и ангиогенеза также могут быть идентифицированы диффузно по всей массе опухоли. Опухолевые клетки плотно аккумулярованы в субпиальной и субэпендимальной зонах, а также собраны вокруг нейронов и кровеносных сосудов в так называемые вторичные структуры.

Существуют разные клеточные подтипы глиобластомы. Некоторые опухоли отличаются выраженным мономорфизмом опухолевых клеток,

включающих, в основном, клетки, имеющие небольшое ядро и скудную цитоплазму (мелкоклеточная глиобластома). Другие же состоят преимущественно из очень больших плеоморфных многоядерных клеток (гигантоклеточная глиобластома). Третий вариант, называемый глиосаркома, состоит из двух клеточных элементов: глиального и саркоматозного. Хотя они выглядят как смешанные глиомы, исследования показали, что оба клеточных компонента имеют сходные генетические aberrации, предполагая, что дает основания предполагать, что саркоматозный компонент происходит путем метаплазии глиального компонента. Глиосаркомы относятся к опухолям IV степени злокачественности похожи на глиобластомы по прогнозу [9, 14].

Астроцитарное происхождение глиобластомы может быть установлено путем введения антител к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), интермедиату, который присутствует как в опухолевых астроцитах, так и в нормальных. Тем не менее, содержание GFAP в злокачественных астроцитах значительно варьирует [9].

Пролиферативная активность опухоли (разрастание путем размножения клеток) – один из важнейших показателей ее биологической агрессивности, в значительной степени определяющий скорость роста новообразования. Для оценки пролиферативной активности новообразования применяют окрашивание антителом Ki-67 или MIB-1, определяя пул клеток, активно синтезирующих нуклеиновые кислоты и находящихся в разных фазах (G₁-, S-, G₂- или M-фаза) клеточного цикла. Их количество выражают в процентах от всех опухолевых клеток в виде индекса пролиферации [9, 13]. Этот показатель значительно варьирует в различных опухолях и в среднем колеблется от 15 до 20%. Однако определенная связь между индексом пролиферации и прогнозом развития заболевания до сих пор не выявлена [9].

Как правило, чем выше пролиферативная активность, тем больше скорость роста новообразования. Очевидно, что степень злокачественности новообразования зависит от скорости роста: чем быстрее опухоль растет, тем

быстрее нарастают ее клинические проявления и тем она злокачественнее. Опухолевый рост прекращается лишь в результате гибели макроорганизма – носителя опухоли [13].

1.1.2 Канцерогенез опухолей головного мозга

Канцерогенез – многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, способствующих нарушению ключевых функций клеток, таких как регуляция пролиферации, дифференцировки, естественной гибели клеток (апоптоз) [15], морфогенетических реакций клетки, неэффективного функционирования факторов специфического и неспецифического противоопухолевого иммунитета.

Перспективным направлением в разработке методов диагностики онкозаболеваний является использование биомаркеров. На сегодняшний день основными биомаркерами глиом головного мозга считаются генетические нарушения. В частности, мутация гена белка-гомолога фосфатазы и тензина (PTEN) [16]. Рецептор PDGF (PDGFR) относится к семейству тирозинкиназных рецепторов и имеет 2 изоформы: PDGFR-a (170 кДа, кодируется геном, расположенным на хромосоме 4q) и PDGFR-b (180 кДа, кодируется геном, расположенным на хромосоме 5q). Оба они активируются при связывании с лигандом, который индуцирует димеризацию и аутофосфорилирование рецептора, в результате чего происходит активация сигнального пути, регулирующего транскрипцию генов [17]. Экспрессия, PDGFR-a обнаруживается исключительно в опухолевых клетках глиомы, что указывает на роль этого рецептора в опухолевой пролиферации, являясь относительно ранним событием в патогенезе астроцитом. В свою очередь, PDGFR-b экспрессируется на гиперплазированной эндотелии микрососудов глиобластомы, что указывает на роль этого рецептора в ангиогенезе.

У больных глиобластомой с небольшой продолжительностью жизни определяют сверхэкспрессию рецептора к эпидермальному фактору роста (EGFR), что коррелирует с высоким индексом пролиферации. Гиперэкспрессия EGFR при глиобластоме, как правило, ассоциируется с амплификацией гена EGFR. Молекулярный скрининг показал, что амплификация EGFR наблюдается в 35-70% случаев глиобластомы. В исследовании [18] в 42% случаев была обнаружена амплификация генов с переменным количеством копий, которая затрагивала более 10% опухолевых клеток. В 28% случаев амплификация представляла собой вставки дополнительных копий гена EGFR в различные локусы 7-ой хромосомы [19].

Матричные металлопротеиназы являются важнейшими протеазами в биологии глиобластомы. От них зависит способность опухоли проникать в окружающую паренхиму мозга и индуцировать неоангиогенез. Они способны разлагать внеклеточный матрикс и базальные мембраны, тем самым открывая пути для миграции эндотелиальных и опухолевых клеток. Кроме того, протеазы могут изменять адгезирующие свойства клеток, действуя на рецепторы клеточной поверхности (интегрины, кадгеринины), которые модулируют подвижность клеток.

В клеточных линиях глиобластомы человека активируются различные металлопротеиназы. Металлопротеиназы также избыточно экспрессируются и на сосудистой сети опухоли, что указывает на их роль в индукции ангиогенеза.

Белок p53 – ядерный белок, состоящий из 393 аминокислот с молекулярной массой 53 кД. Тетрамер p53 функционирует как транскрипционный фактор, связываясь своим карбоксильным окончанием со специфическими регионами генов-мишеней. Белок p53 находится в цитоплазме в латентном состоянии. Различные стрессогенные стимулы (повреждение ДНК, гипоксия, тепловой шок, метаболические изменения, воздействие цитокинов) активируют белок p53, вследствие чего возникают остановка клеточного цикла

или апоптоз. Таким образом, белок p53 выполняет функцию опухолевого супрессора [20].

Белок-гомолог фосфатазы и тензина, PTEN, является супрессором опухолевого роста. Установлено, что он имеет фосфатидил-инозитол-фосфатазную активность, а, именно, способен отщеплять фосфаты от 3'-позиции в инозитольном кольце. Это обуславливает роль PTEN в качестве регулятора фосфатидилинозитол-3-киназных (PI3K) сигнальных путей клетки, которые участвуют в регуляции ангиогенеза, клеточного цикла, миграции/инвазии клеток и клеточной выживаемости. Изменение экспрессионного уровня PTEN коррелирует со степенью злокачественности глиом и, как следствие, с продолжительностью жизни пациентов, страдающих опухолями ГМ данного типа. Так, потеря функции PTEN коррелирует с плохим прогнозом выживаемости при анапластической астроцитоме и глиобластоме. Отсутствие гена PTEN в клетках ГБ стимулирует ангиогенез и предотвращает апоптоз даже после лечения мощными химиотерапевтическими препаратами [21, 23].

1.1.3 Этиологические и эпидемиологические факторы риска

Глиальные опухоли головного мозга составляют 40 % всех опухолей центральной нервной системы. Заболеваемость злокачественными глиомами составляет 5 – 8 случаев на 100 тысяч населения [1, 22]. Глиобластома – наиболее распространенная и высоколетальная первичная опухоль мозга. Частота выявления этой опухоли составляет примерно 12 – 16% среди всех внутричерепных новообразований, 40% от всех первичных опухолей головного мозга и 80% от первичных новообразований ЦНС с высокой степенью злокачественности. Глиобластомы являются наиболее частой причиной смерти при опухолях ЦНС [24]. Средняя продолжительность жизни больных глиобластомой составляет до 1 года – 68,1%, до 2 лет — 23,7%, до 3 лет — 4,3%.

Также высока частота рецидивирования опухоли. У 60–90% больных возникают локальные рецидивы (часто в пределах 2 см от первичной опухоли).

Существует много потенциальных факторов риска, вносящих определенный вклад в развитие опухоли. Аллергические и атопические состояния, такие как астма или экзема, снижают риск развития глиом головного мозга. Результаты мета-анализа показывают, что аллергия снижает риск развития глиомы почти на 40% [25].

К одним из факторов, увеличивающих риск развития глиальных опухолей, относится воздействие ионизирующего излучения. Компьютерная томография эффективно используется в клинике, однако существуют риски появления опухолей от ионизирующего излучения, в частности, для детей, которые более радиочувствительны, чем взрослые. В нескольких исследованиях было показано увеличение риска развития лейкоemий и опухолей головного мозга, у детей, получавших профилактическое облучение [26].

Также рассматривается потенциальная связь влияния неионизирующего излучения. Воздействие мобильных телефонов на развитие глиом, является недоказанным фактором, поскольку период реакции организма на данное влияние неизвестен, из-за отсутствия информации о долгосрочном использовании сотовых телефонов, так как срок эксплуатации не превышает 10-15 лет [27].

1.2 Современная диагностика и методы лечения

Ограниченные возможности хирургического лечения и резистентность опухолей глиального происхождения к лучевой и химиотерапии привлекают большое внимание к проблеме лечения больных с глиомами головного мозга.

Общий принцип лечения больных с глиальными опухолями головного мозга подразумевает комплексность. Текущим стандартом лечения является максимально безопасная хирургическая резекция с последующей комбинацией

лучевой и химиотерапии с использованием препарата темозоломида [28].

Для диагностики глиом головного мозга применяют компьютерную томографию (КТ), магнитно-резонансную томографию (МРТ) и позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ) [29]. Обладая различными информационными возможностями, эти методы дополняют друг друга, позволяя детализировать различные стороны диагноза. МРТ уточняет топографо-анатомические взаимоотношения, особенности распространения и направления роста опухоли, КТ вносит дополнительную диагностическую информацию в определение гистобиологических качеств опухоли и позволяет визуализировать степень отграничения опухоли и перифокального отека, ПЭТ обладает высокой степенью достоверности в установлении диагноза и обеспечивает раннее определение рецидивирования процесса. Ангиографическое исследование сосудов головного мозга выявляет изменения нормальной топографии сосудов или патологическую сосудистую сеть.

1.3 Циркулирующие опухолевые клетки

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) являются основным источником для формирования метастаз. Агрессивные опухоли выбрасывают млн. таких клеток в кровоток каждый день, но у большинства больных развивается всего несколько метастазов, так как метастазирование является крайне сложным процессом. Раковые клетки оставляют первичную опухоль достаточно легко, но большинство ЦОК в кровотоке погибает, возможно, в результате потери сигналов выживания [30].

ЦОК изначально происходят от первичной опухоли и могут проникать в кровоток путем интравазации; этот активный процесс поддерживается эпителиально-мезенхимальным переходом, приобретая свойства для свободной миграции в ткани различных органов. В свою очередь обратный процесс, а именно мезенхимально-эпителиальный переход опухолевых клеток, непосредственно происходящий в тканях, способствует их пролиферации и образованию скоплений [31].

В состоянии покоя ЦОК могут находиться различные периоды времени, иногда даже в течение многих десятилетий. В это время они могут подвергаться изменениям, в частности, сдвигам в обмене веществ для наилучшего приспособления к новой среде, и после успешной колонизации, образуют детектируемые метастазы, которые могут перерасти в клинически значимые поражения [30].

Глиобластома является наиболее частой первичной опухолью головного мозга, обладающей лекарственной устойчивостью, несмотря на мультимодальное лечение.

Во многих типах рака циркулирующие опухолевые клетки имеют прогностическое значение [32]. Однако при определении ЦОК при глиобластоме появляются трудности их обнаружения, поскольку для их выявления используют обычно маркеры эпителиальных опухолей, в частности, цитокератины.

1.4 Аптамеры

Одним из самых востребованных и актуальных направлений современной персонализированной медицины является разработка технологии получения новых средств диагностики и терапии. В качестве препаратов для персонализированной медицины стали использовать биофармацевтики [33]. Наиболее популярными диагностическими и терапевтическими препаратами становятся олигонуклеотиды – функциональные аналоги моноклональных антител.

Аптамеры представляют собой одноцепочечную молекулу РНК или ДНК, размером 30 – 80 нуклеотидов (области для посадки праймеров при амплификации 20 нуклеотидов, остальная длина – это область случайных нуклеотидных последовательностей). Аптамеры образуют трехмерную структуру, в результате взаимодействия комплементарных участков цепи [34, 35].

Пространственное расположение фосфатных групп и оснований создают уникальные функциональные группы, которые способны связываться с определенными мишенями с помощью электростатических, ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей [36].

В роли мишеней при подборе аптамеров методом селекции *in vitro* используют белки клеточной стенки или целые клетки. Чем больше мишень имеет функциональных групп и структурных мотивов, тем больше связей она образует с аптамерами, что приводит к увеличению аффинности и специфичности [37, 38]. Белки, расположенные на поверхности различных типов клеток или появившиеся при трансформации клетки (как например, злокачественные клетки опухоли) представляют собой перспективную мишень для диагностики заболеваний и адресной доставки лекарств с помощью аптамеров.

По своим функциям аптамеры приходят на замену моноклональных антител, так как имеют ряд преимуществ, главные из которых – высокая специфичность, стабильность и слабая иммуногенность.

Технология селекции аптамеров SELEX (системная эволюция лигандов экспоненциальным обогащением) представляет собой процедуру скрининга большой библиотеки олигонуклеотидов, имеющих случайные последовательности [39, 40]. Процедура селекции проходит на протяжении 10-15 раундов. Раунды предназначены для отбора уникальных последовательностей, специфичных для молекулы-мишени. При отборе смесь олигонуклеотидов постепенно обогащается и отбираются аптамеры, имеющие повышенное сродство к мишени. Аффинность аптамеров к мишени в результате селекции увеличивается на несколько порядков. После достижения наибольшей аффинности, аптамеры клонируют и секвенируют.

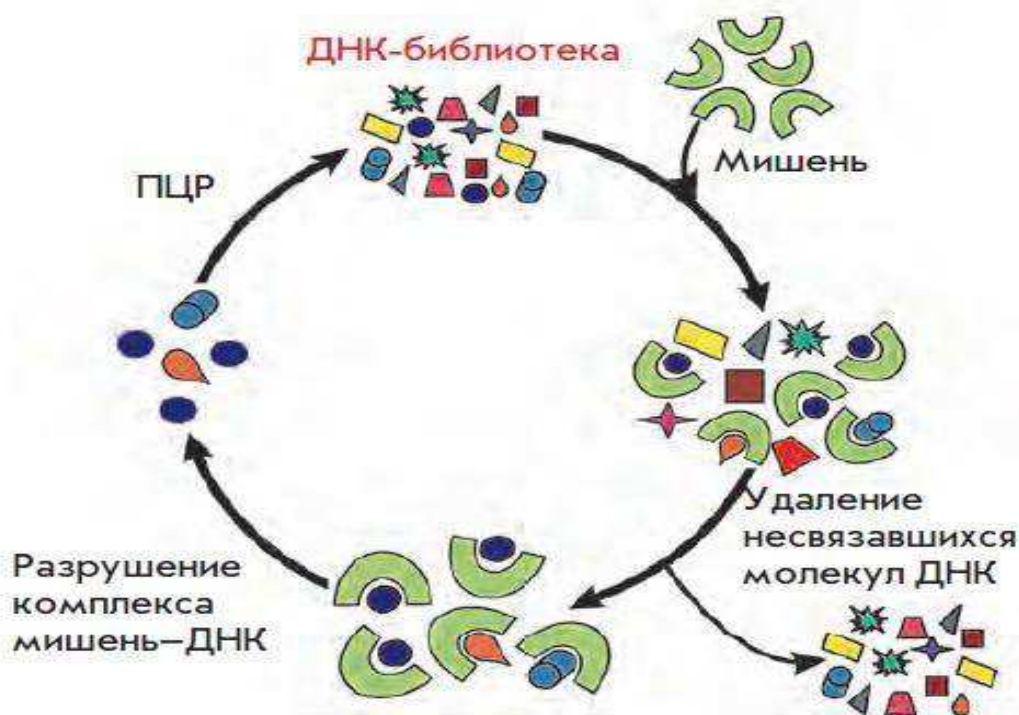


Рисунок 1 – Общая схема селекции аптамеров.

2 Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

Методы изготовления гистологических срезов, выделения циркулирующих клеток, интраоперационной визуализации и проточной цитометрии подразумевает под собой использование в качестве объектов кровь и ткань пациентов. Послеоперационный материал: кровь, ткани опухоли мозга человека предоставлялись КГБУЗ «Красноярской межрайонной клинической больницы скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича» нейрохирургом А.А. Народовым. Забор послеоперационного материала производили у пациентов в возрасте 50-71 года, больных с глиальными опухолями.

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).

2.2 Методика изготовления гистологических криосрезов с помощью аптамеров

Небольшие кусочки размером 3x5 миллиметра, отмывали дважды на шейкере (5 минут 270 оборотов при комнатной температуре) в 2 мл 0,2% раствора Тритона. Затем при таких же условиях ткани дважды отмывали в фосфатном буфере, содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Для маскировки неспецифических сайтов связывания ткани инкубировали с 2 мл маскирующей РНК (Yeast PNA) в концентрации 1 нг/мкл в течение часа при температуре 6°C . Затем ткань отмывали фосфатным буфером, содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} , и инкубировали с аптамерами, мечеными флуоресцентной меткой

Cy3 (конечная концентрация 50нМ) в течение двух часов на шейкере (240 оборотов при комнатной температуре). В заключении перед крионарезкой ткани дважды отмывали на шейкере (5 минут 240 оборотов при комнатной температуре) в фосфатном буфере, содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Срезы готовили на криостате Microm HM525 Cryostat при температуре -25°C, подготовленные срезы аккуратно помещали на полилизинные стекла, капали по 5 мкл матирующей средой и накрывали покровным стеклом.

С каждой ткани изготавливали по два стекла, одно сразу накрывали покровным стеклом (для анализа флуоресценции), с другим производили окрашивание гематоксилином-эозином.

Окрашивали гематоксилином в течение 6 минут, затем промывали в горячей воде и дважды холодной воды. Далее окрашивали 7 минут в эозине. Промывали в двух порциях дистиллированной воды для удаления избытка эозина. Воду удаляли из срезов в одной порции 70% этанола, двух порциях 96% этанола. Экспозиция в каждой порции спирта – 3 минуты. Просветляли срезы в двух порциях карбол-ксилола – по 5 минут и производили окончательное обезвоживание срезов в двух порциях ксилола.

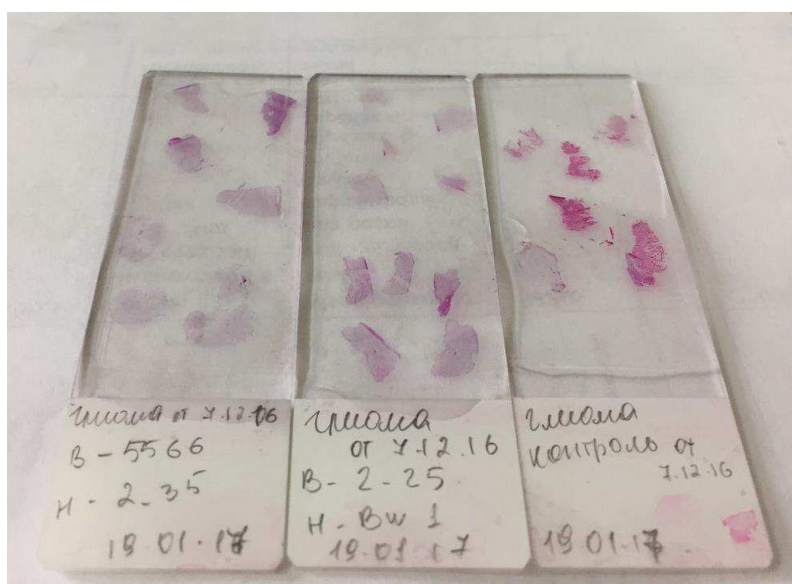


Рисунок 2 – Покровные стекла с криосрезами

Полученные образцы исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss).

Фотографии обрабатывались с использованием программы для обработки и анализа изображения Zeiss Efficient Navigation (ZEN) Carl Zeiss (Германия).

2.3 Методика окрашивания гистологических парафиновых срезов с помощью аптамеров

Кусочки ткани площадью 2-3 см и толщиной 5-7 мм завязывают в марлевый мешочек с этикеткой и погружают в фиксатор (10% формалин) на 24 часа, который обеспечивает стабилизацию тканевых структур и их уплотнение.

Затем кусочки промывают в течение 6 часов под проточной водой. Обезвоживание ткани проходит в спиртах восходящей концентрации, начиная с 70%, потом 96% и 100% время экспозиции 24 часа в каждом.

Для заливки в парафин сначала кусочки погружают в смесь спирта и ксилола (1:1) на два часа, потом в «кашу» ксилола и парафина (1:1) при $t=37^{\circ}\text{C}$ на два часа. Далее образцы помещают в жидкий парафин на два часа при $t=56^{\circ}\text{C}$, после дают парафину остыть и затвердеть. Перед нарезкой вырезают блоки и закрепляют на деревянном кубике.

Кубики вставляют в специальный прибор микротом Microm HM325, и микротомным ножом срезается тонкой слой (срез) заданной толщины. Срезы помещают на поверхность тёплой воды для их расправления, а затем на предметное стекло.

Перед окрашиванием образцы освобождают от парафина, проводя по батарее растворителей: ксилол, спирт 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 60 %, вода (по 3 минуты). Окрашивание гематоксилин 6 минут, промывка в горячей холодной воде, окрашивание в эозине в течение 7 минут, промывка в дистиллированной воде.

Опять препарат обезвоживают (проводя по батарее спиртов с

возрастающей концентрацией- 70%, 96% и 96%), а затем просветляют (в двух карбол-ксилолах и двух ксилолах по 5 минут) - для удаления лишней краски. В конце на препарат наносят матирующую срезу и закрывают покровным стеклом.



Рисунок 3 – Покровные стекла с парафиновыми срезами.

Полученные образцы исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss). Фотографии обрабатывались с использованием программы для обработки и анализа изображения Zeiss Efficient Navigation (ZEN) Carl Zeiss (Германия).

С каждой ткани изготавливали по два стекла, одно сразу накрывали покровным стеклом без красителей (для анализа флуоресценции), с другим производили окрашивание гематоксилином-эозином.

2.4 Методика выделения циркулирующих опухолевых клеток из периферической крови больных, с помощью аптамеров и магнитных наночастиц

Использовали 2-3 мл концентрированных клеток крови без плазмы в зависимости от объема образца. Далее образцы инкубировали на шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре с раствором хлорида аммония, в

конечной концентрации 0,42%. После этапа инкубации оставшиеся клетки осаждали центрифугированием (на 5 мин при 3000 об/мин), убрали надосадок и оставшиеся клетки ресуспендировали в 100 мкл PBS-буфера.

Для маскировки неспецифических сайтов связывания клеточную суспензию инкубировали с 10 мкл маскирующей РНК с концентрацией 10нМ в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее образец центрифугировали (5 минут при 3000об/мин), убрали надосадок и инкубировали на протяжении 30 минут в 100 мкл готового раствора биотинилированных аптамеров в конечной концентрации 100нМ, заранее смешанных с 4 мкл магнитных частиц. После 20 минут образцы помещали на магнит для концентрирования магнитны частиц с клетками и аптамерами на боковой поверхности пробирки, после чего удаляли надосадоочную жидкость.

Концентрированный осадок клеток инкубировали на протяжении 30 минут в 100 мкл раствора аптамеров, меченных флуоресцентной меткой в конечной концентрации 50нМ. Для количественного определения циркулирующих опухолевых клеток и микроэмбол в крови больных готовили мазки. Для приготовления мазков, приготовленные окрашенные образцы центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин, убрали надосадок. Осадок наносили на предметное стекло. Мазки фиксировались в метаноле в течение 5 минут, затем окрашивали с помощью красителя Романовского-Гимза.

Полученные образцы исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss). Фотографии обрабатывали с использованием программы для обработки и анализа изображения Zeiss Efficient Navigation (ZEN) Carl Zeiss (Германия).

2.5 Метод интраоперационной визуализации глиобластомы головного мозга

Для визуализации опухолей головного мозга использовали операционный флуоресцентный микроскоп OPMI Pentero (Carl Zeiss, Germany).

Аналитические исследования клинических образцов проводили в стандартных условиях операционной при комнатной температуре, нормальном уровне влажности с учетом требований техники безопасности.

ДНК-аптамеры и маскирующую ДНК до использования хранили при температуре не выше -20°C . Перед использованием ДНК-аптамеры размораживали, нагревали до 95°C в течение 5 мин, а затем быстро помещали на лед на 10-15 минут для восстановления нужной конформации аптамеров.

Исследуемую ткань промывали фосфатным буфером, содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} . С помощью пипетки или распылителя наносили 0,1- 5 мл аптамеров (2 мкМ) на образец. Через 1-3 минуты ткань промывали фосфатным буфером. Регистрировали флуоресценцию с помощью операционного флуоресцентного микроскопа со следующими оптическими характеристиками: длина волны возбуждения 630-640нм; испускания 780 ± 60 нм.

2.6 Метод проточной цитометрии

Исследования аффинности и специфичности синтетических аптамеров к глиоме проводили методом проточной цитометрии.

Для выбора наиболее аффинных к своей мишени синтетических аптамеров оценивали связывание аптамеров со своей мишенью – тканью глиомы головного мозга.

Для определения специфичности синтетических аптамеров проводили анализ связывания аптамеров с негативными мишенями – тканями менингиомы и метастазов опухолей различных локализаций в головной мозг и здоровыми клетками головного мозга.

Каждую из синтетических последовательностей в конечной концентрации 50 нМ инкубировали в течение 30 минут с суспензией клеток позитивных или негативных мишеней. С целью уменьшения неспецифического связывания олигонуклеотидов клеточные суспензии предварительно инкубировали с маскирующей ДНК в конечной концентрации 1 нг/мкл в течение 30 минут.

В качестве контролей использовали пробы, проинкубированные с одноцепочечной ДНК-библиотекой N100, а также пробы клеток без предварительной инкубации с аптамерами.

Образцы исследовали методом проточной цитометрии на цитометре FC-500 (Beckman Coulter Inc., США).

3. Результаты и их обсуждение

Для наглядности данные, полученные в ходе исследований по разработке методов диагностики глиомы с помощью аптамеров, представлены в виде графиков, рисунков и таблиц.

Результаты, полученные методом проточной цитометрии, показали, что наибольшим сродством к клеткам глиобластомы головного мозга обладают аптамеры – родоначальники семейств, при достаточно высоких показателях связывания с клетками они практически не связывались со здоровыми клетками мозга и другими типами опухолей головного мозга.

Анализ специфичности показал, что процент связывания аптамеров с негативными мишенями и библиотекой ниже по сравнению со связыванием аптамеров с клетками глиобластомы. Таким образом, полученные синтетические аптамеры к глиобластоме имели слабое сродство к клеткам менингиомы и метастазов в мозг опухолей различной локализации.

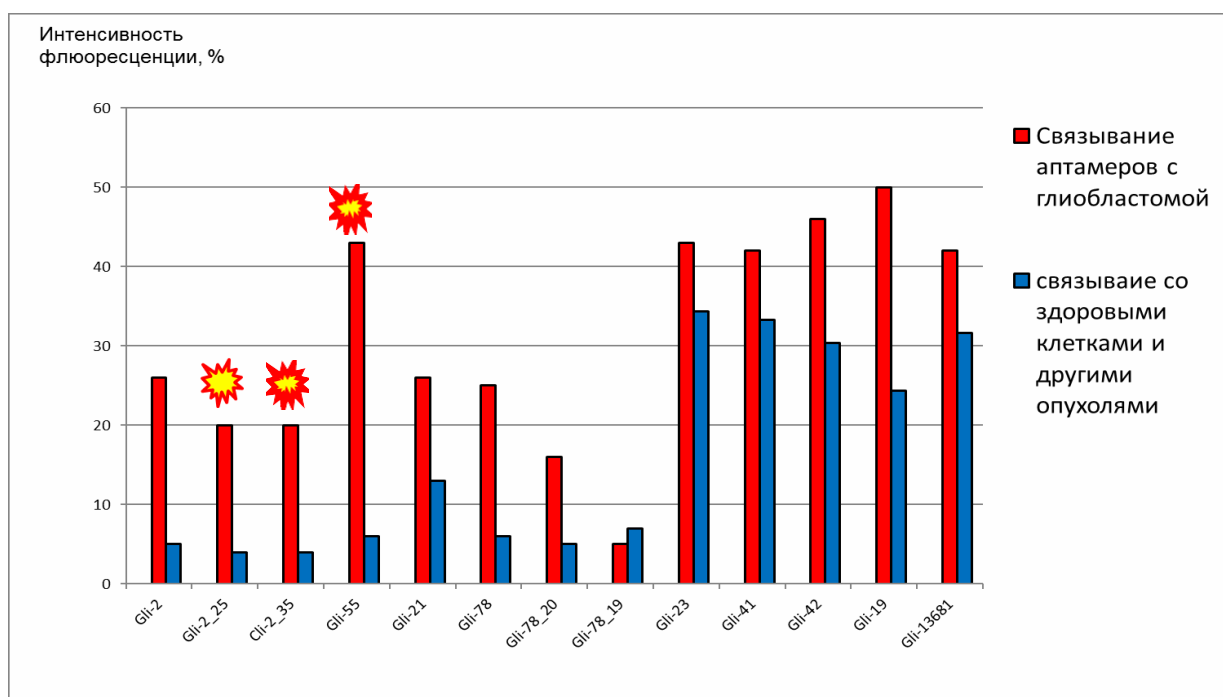


Рисунок 4 – Связывание аптамеров с опухолевыми и здоровыми клетками.

Среди всех аптамеров, 2_25, 2_35 и 55_66 показали наибольшую специфичность к опухолевым клеткам глиобластомы, на рисунке 5 показаны вероятные вторичные структуры.

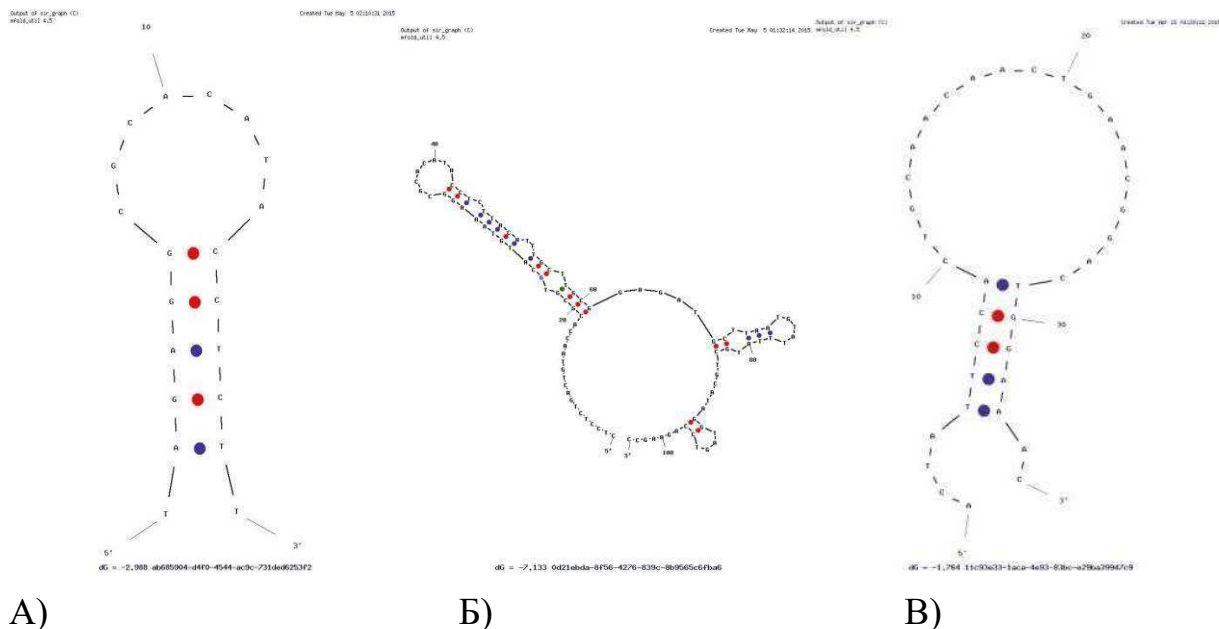


Рисунок 5 – Вероятные вторичные структуры аптамеров: а) 2_25, б) 55_66, в) 2_35.

Для подтверждения данных, полученных с помощью метода проточной цитометрии, были изготовлены криосрезы.

Результаты исследований показали, что аптамеры Gli-2_25, Gli-2_35 и Gli-55 специфически связывались с разными эпитопами клеток глиобластомы. Gli-2_35 окрашивали ядра и строму опухолевых клеток, что видно при увеличении 63× и 3D изображении (Рисунок 6), Gli-55, Gli-2_25 связывались с цитоплазмой и стромой.

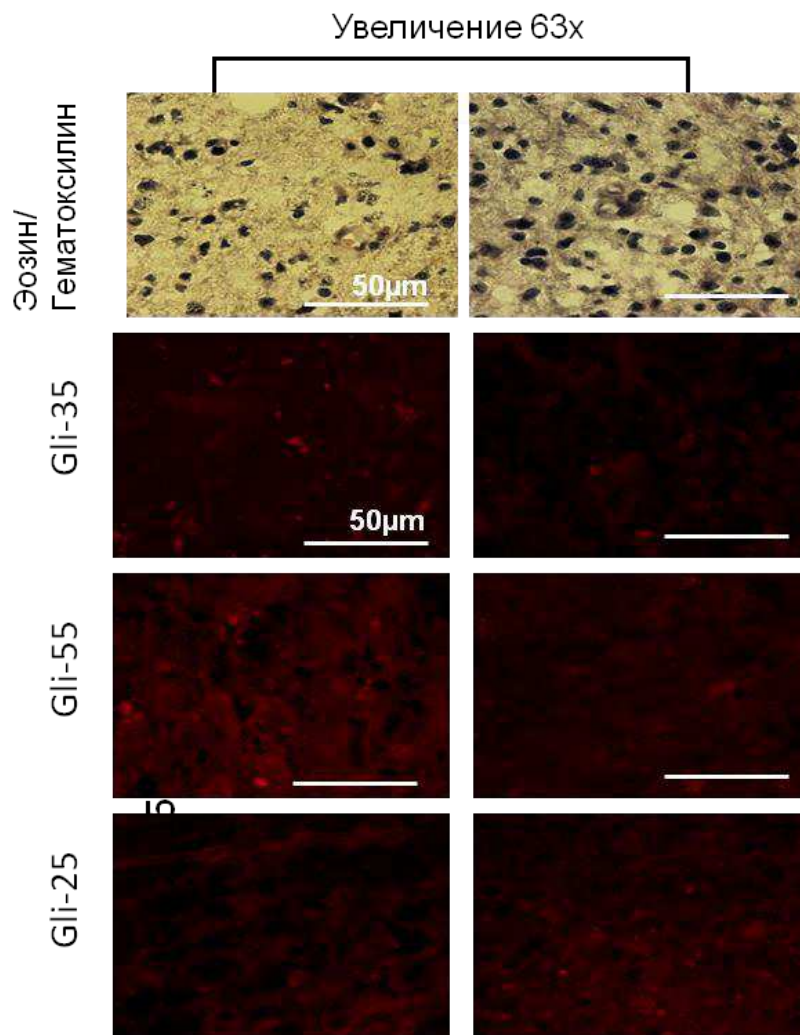
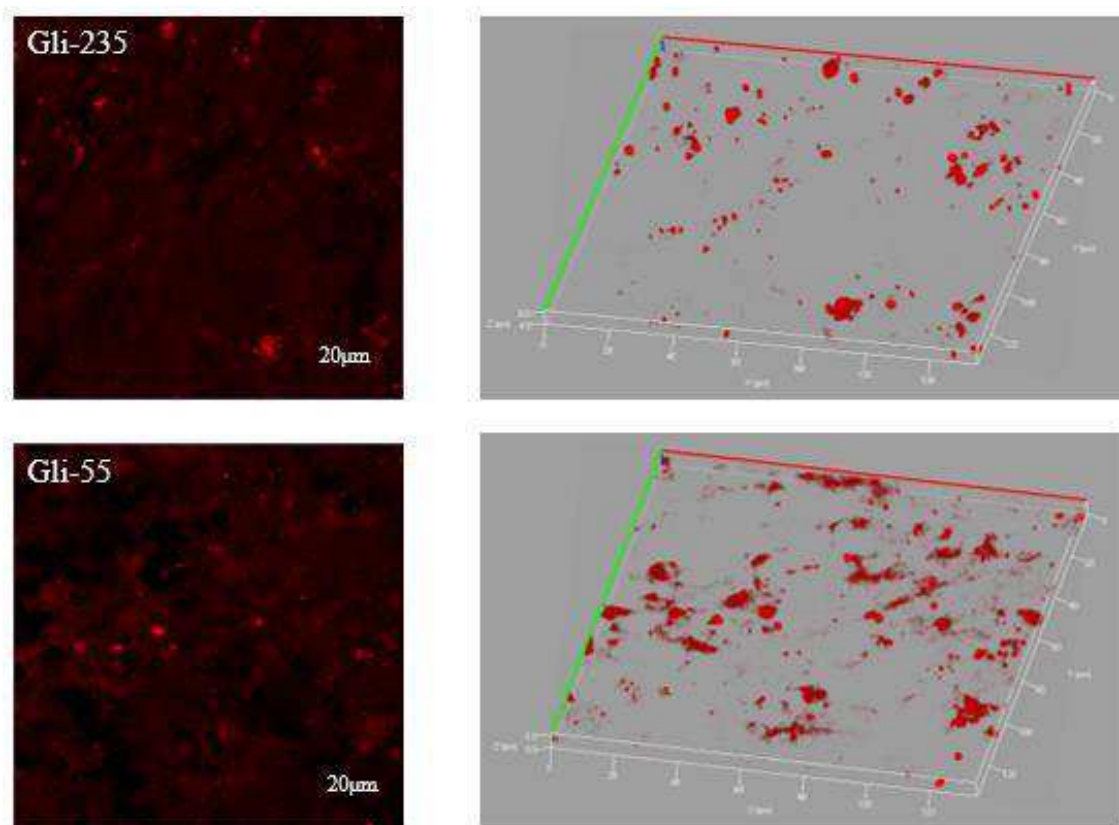


Рисунок 6 – Гистологические срезы глиобластомы.

В срезах глиобластомы, подвергшихся гематоксилин-эозиновому окрашиванию, было обнаружено многочисленное скопление атипичных клеток различной величины и формы. В опухолевых клетках глиобластомы наблюдалась гиперхромия ядер. По всему срезу выявили участки с некротизированной тканью. При окрашивании данных срезов глиобластомы с аптамерами Gli-25, Gli-35 и Gli-55 выявлена интенсивная флюоресценция в опухолевой ткани глиобластомы, однако некоторые атипичные клетки светились ярче относительно опухолевой ткани. Также было замечено, что данный тип клеток имел фокусное распределение по всей ткани глиобластомы.



А)

Б)

Рисунок 7 – Гистологические срезы глиобластомы: а) окрашивание аптамером Gli-2_35, Gli-55_66, б) 3D изображение.

Флюоресцентное окрашивание аптамерами Gli-25, Gli-35 и Gli-55 показало, что использованные аптамеры одинаково высокоспецифичны к опухолевой ткани глиобластомы. Можно предположить, что выбранные аптамеры Gli-25, Gli-35 и Gli-55 связываются с основными рецепторами атипичных клеток глиобластомы, что свою очередь, позволяет использовать данные олигонуклеотиды как высоспефичные средства диагностики к опухолевым клеткам глиобластомы. Также данные аптамеры можно использовать в качестве комбинированного средства диагностики глиобластомы, повышая риск обнаружения большего количества атипичных клеток, что в свою очередь, позволяет увеличить диагностический эффект препарата на основе данных аптамеров. Таким образом, аптамеры Gli-2_35, Gli-2_25 и Gli-55 можно использовать для гистохимического описания опухолевых тканей.

Поскольку аптамеры обладают селективностью к глиобластоме, то их можно использовать для визуализации опухоли во время операции. Это важно, поскольку данный метод помогает хирургу более точно убрать опухолевую ткань и максимально сохранить прилегающие здоровые ткани.

Выявление возможности интраоперационной визуализации опухолевой ткани было смоделировано на послеоперационном морфологическом препарате больного глиобластомой с использованием хирургического флуоресцентного микроскопа OPMI Pentero. Послеоперационную ткань промывали фосфатным буфером, после чего на ее поверхность наносили аптамеры, меченные флуоресцентной меткой Brilliant Violet и инкубировали 5 минут, а затем снова промывали (Рисунок 8). Менингиомы и здоровые прилегающие ткани аптамерами не окрашивались (Рисунок 9). Brilliant Violet 711 – стабильный, нетоксичный краситель с повышенной яркостью, флуоресцирующий в дальней красной области, где не бывает аутофлуоресценции, таким образом, этот краситель можно использовать для хирургических операций.

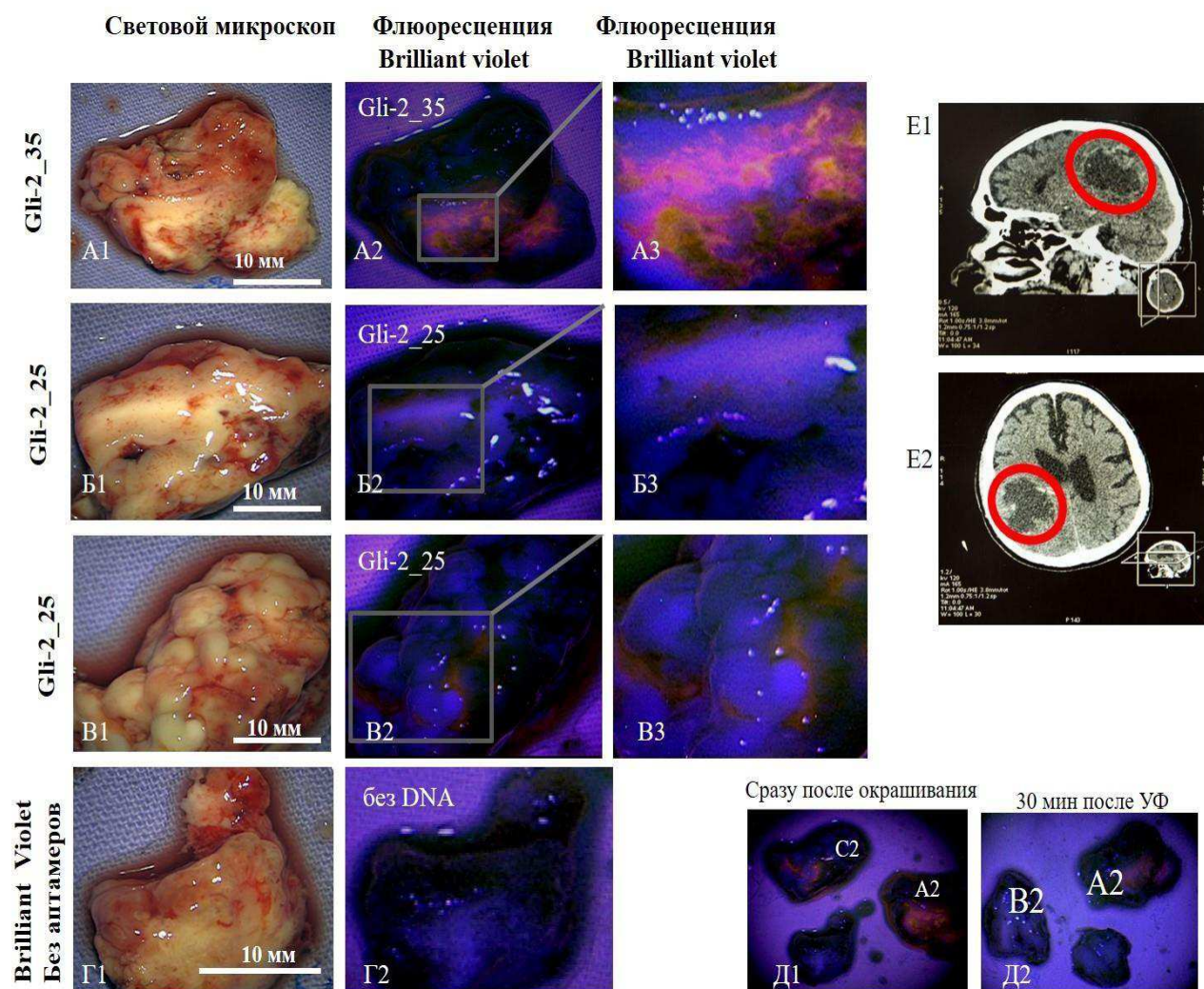


Рисунок 8 – Глиобластома, окрашенная аптамерами Gli-2_35. (A), Gli-2_25 (B, C), модифицированными Brilliant Violet и только красителем в качестве контроля (D). Флуоресценция наблюдалась в течение 30 минут непрерывного облучения ультрафиолетом с использованием операционного микроскопа ОРМІ Pentero (Carl Zeiss, Germany).

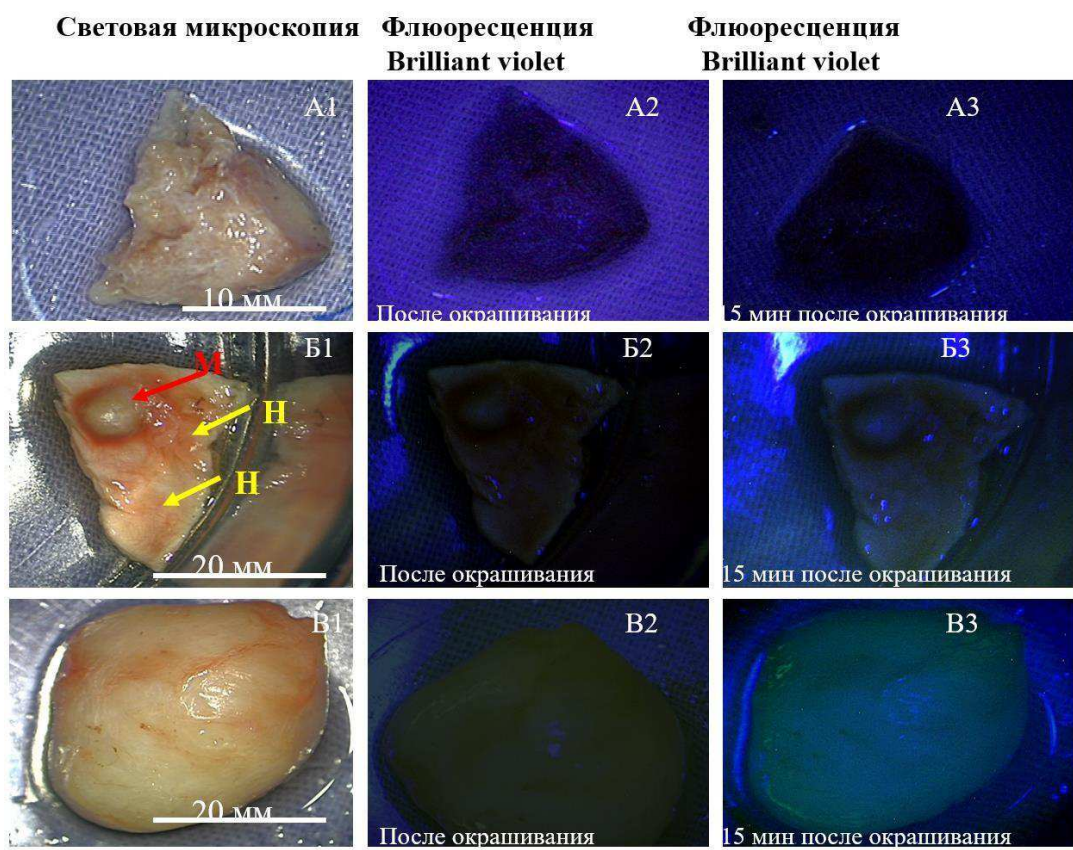
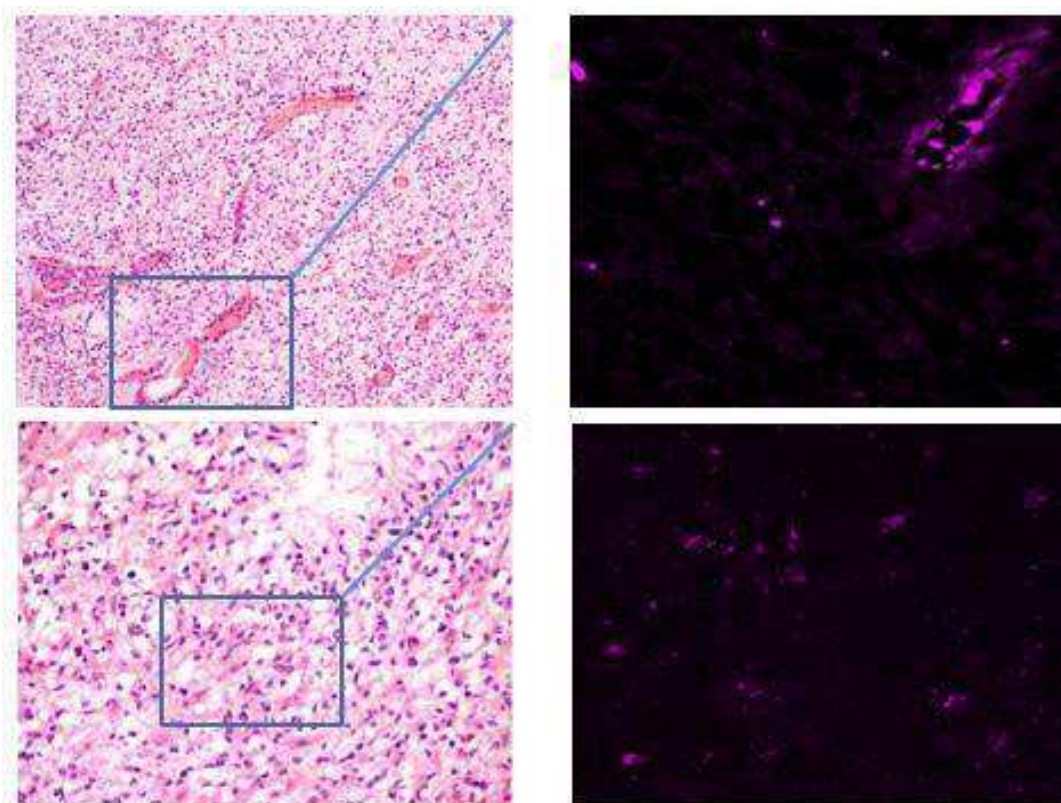


Рисунок 9 – Макпрепараты, окрашенные аптамерами: менингиома (А, С и красная стрелка на В) и здоровая ткань (желтая стрелка на В), изображения получены на операционном флуоресцентном микроскопе OPMI Pentero (Carl Zeiss, Germany).

Для подтверждения диагноза и способности аптамеров связываться с клетками глиобластомы были изготовлены парафиновые срезы тканей (рисунок 10). С помощью метода световой микроскопии выявили наличие гиперклеточности, пролиферации сосудов, клеточного плеоморфизма и некроза. В соответствии с системой оценки ВОЗ, именно некроз и пролиферация микрососудов в пределах опухоли являются характерными особенностями глиобластомы. Также лазерная сканирующая микроскопия показала связывание аптамеров с клетками ткани и сосудов.



А)

Б)

Рисунок 10 – Гистологические срезы глиобластомы: а) окрашивание гематоксилин/эозин, б) окрашивание аптамером Gli-2_35, модифицированным красителем Brilliant Violet.

Далее представлены данные интраоперационной визуализации пациента с повторной операции с диагнозом полиморфноклеточная глиобластома с очагами некроза ткани и множественными кровоизлияниями, после проведения курса химио и лучевой терапии, стали отмечаться нарушения критики, появления жалоб на усиление головной боли. Через восемь месяцев после первой резекции опухоли при проведении МРТ с контрастом выявлен рецидив объемного образования в левой височной области.

По рисунку 11 наглядно видно, что опухоль имеет некротическую структуру, поэтому аптамеры не связываются с клетками и флюоресценция не наблюдается. Во время операции очаг опухоли, а именно некроз тканей хорошо индентифицируется и поэтому без проблем удаляется хирургическим путем.

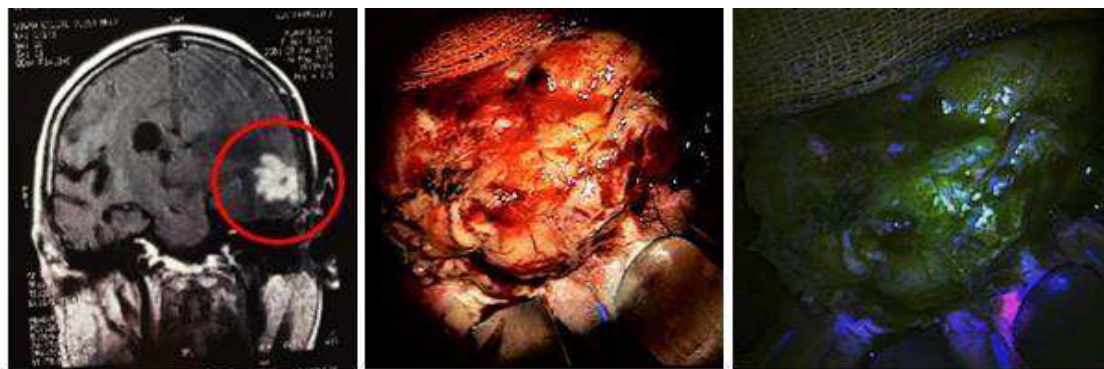


Рисунок 11 – Пациент с глиобластомой, повторная операция: а) снимок мрт, б) световая микроскопия опухоли, в) флюоресценция опухоли.

Далее самое сложное – определить на каком уровне заканчивается зона инфильтративного роста опухоли, так как в выживаемости пациента важным фактором является максимально возможная степень резекции. Для этого производили окрашивание тканей аптамером Gli-2_35 с флюоресцентной меткой Brilliant Violet (рисунок 12). После первого окрашивания наблюдалась яркая флюоресценция тканей, поэтому данный слой был удален. Второе окрашивание также показало наличие опухолевых клеток, но уже в меньшем количестве. Данный слой так же был подвержен резекции. При последнем окрашивании аптамеров флюоресценция не наблюдалась, в связи с этим был сделан вывод, что во время операции все видимые опухолевые клетки были удалены.

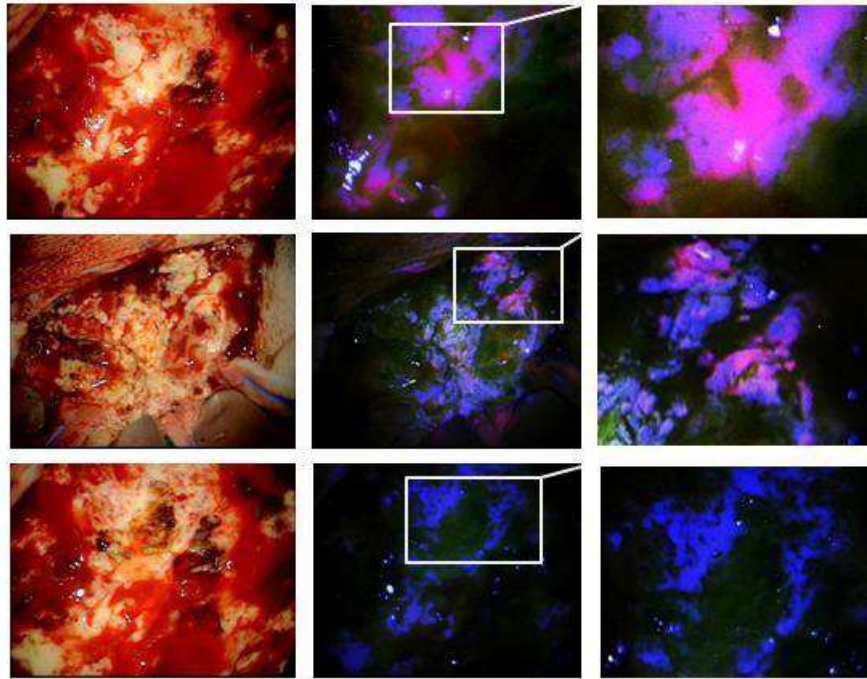


Рисунок – 12 Окрашивание глиобластомы аптамером Gli_2-35 с флюоресцентной меткой Brilliant Violet во время операции.

Кусочки тканей, удаленные во время операции, продолжали флюоресцировать в течение 30 минут (рисунок 13).

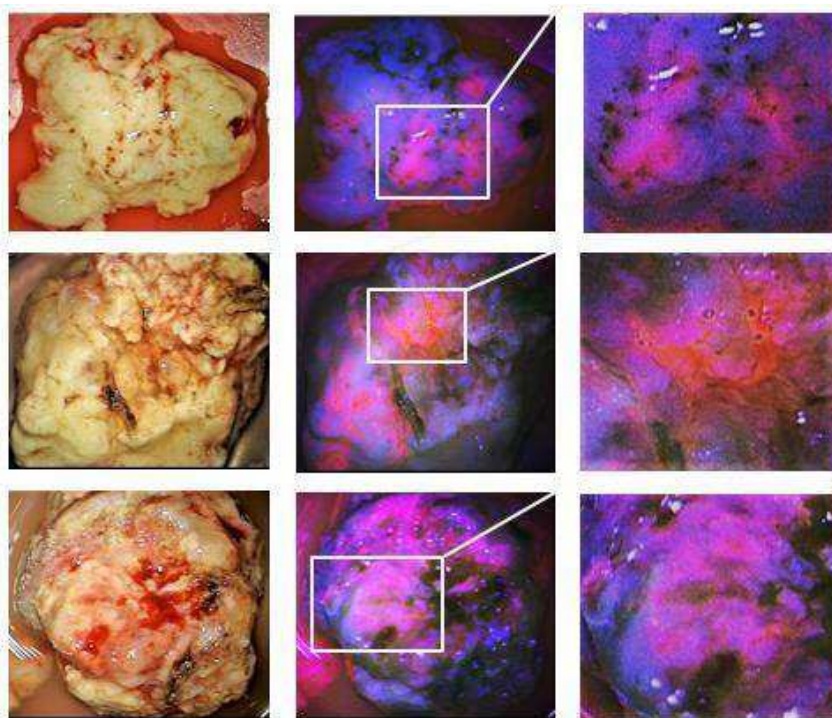
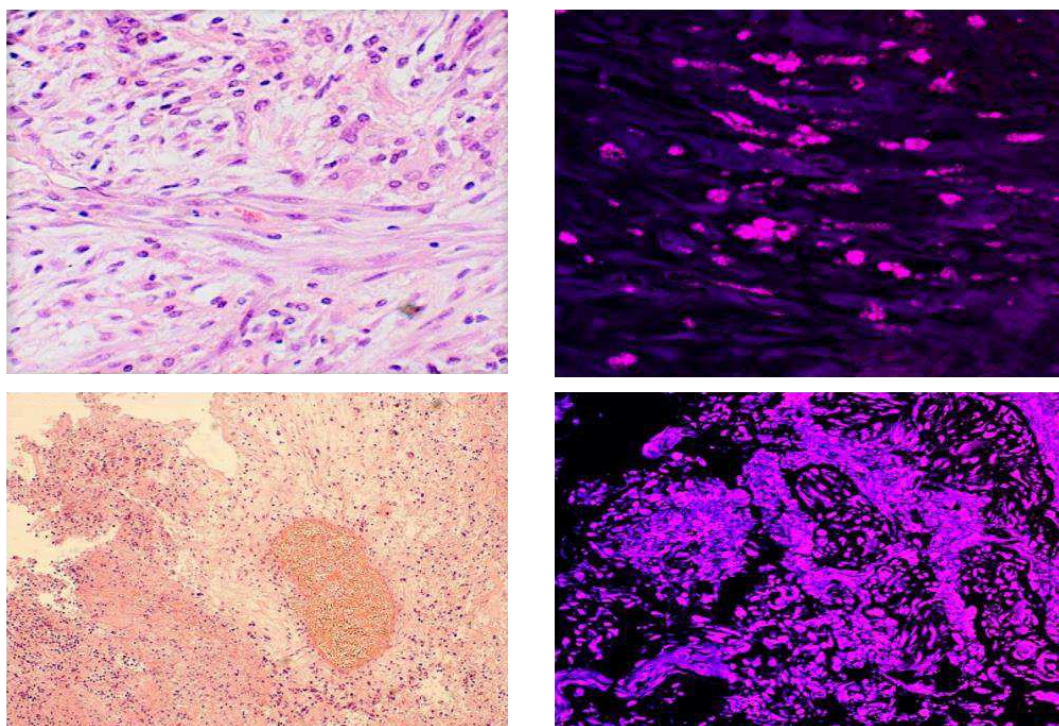


Рисунок 13 – Флюоресценция удаленных участков опухоли

Таким образом, было показано, что аптамер Gli_2-35, меченный флуоресцентной меткой Brilliant Violet, локализовался в опухолевых очагах ткани. Использованная методика проста в применении и может использоваться во время операций. При этом немаловажно, что используемые для визуализации опухолевых очагов аптамеры, нетоксичны и неиммуногенны.



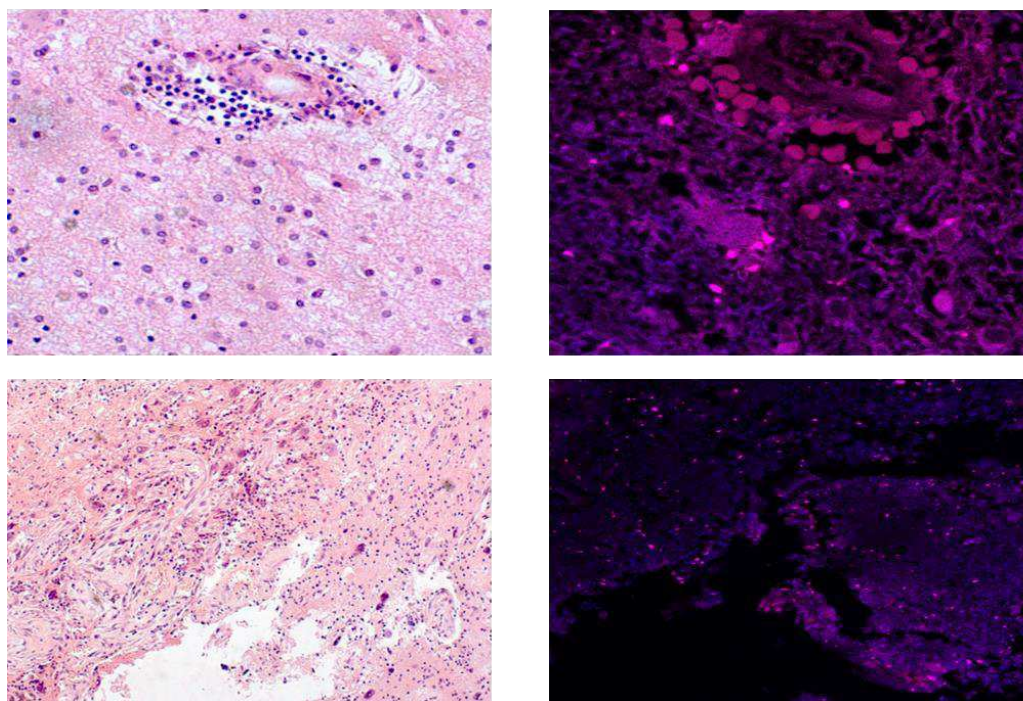
А)

Б)

Рисунок 14 – Гистологические срезы глиобластомы: а) окрашивание гематоксилин/эозин, б) окрашивание аптамером Gli-2_35, модифицированным красителем Brilliant Violet.

Гистологическое исследование макропрепаратов, полученных после операции (рисунок 14) подтвердили диагноз полиморфноклеточной глиобластомы, так же из рисунка 14б видно, что аптамеры с флуоресцентной меткой связались с клетками глиобластомы, о чем свидетельствует интенсивная флуоресценция. В срезах, подвергшихся гематоксилин-эозиновому окрашиванию, было обнаружено многочисленное скопление атипичных клеток

различной величины и формы. По всему срезу выявили участки с некротизированной тканью.



А)

Б)

Рисунок 15 – Гистологические срезы прилежащих тканей глиобластомы: а) окрашивание гематоксилин/эозин, б) окрашивание аптамером Gli-2_35, модифицированным красителем Brilliant Violet.

Гистологическое исследование макропрепаратов прилежащих тканей (рисунок 15) показало наличие опухолевых клеток, о чем свидетельствует выявленная флюоресценция. Полученный результат доказывает, то что удаленные участки прилежащих тканей опухоли являются опасными, так как имеют опухолевые клетки и в дальнейшем могут привести к рецидиву заболевания.

Представленный метод может быть использован для повышения радикальности хирургического лечения глиобластомы, что позволит уменьшить риск рецидива заболевания и улучшить отдаленные результаты лечения. Кроме того, в настоящее время данная методика может быть использована для оценки

радикальности удаления опухоли на основании обследования удаленного макропрепарата.

Циркулирующие опухолевые клетки являются важным прогностическим параметром течения заболевания и мониторинга противоопухолевой терапии. Полученные результаты (рисунок 16) показали то, что аптамер Gli_2-35 с меткой Су5 окрашивают ЦОКи в крови больных опухолью мозга.

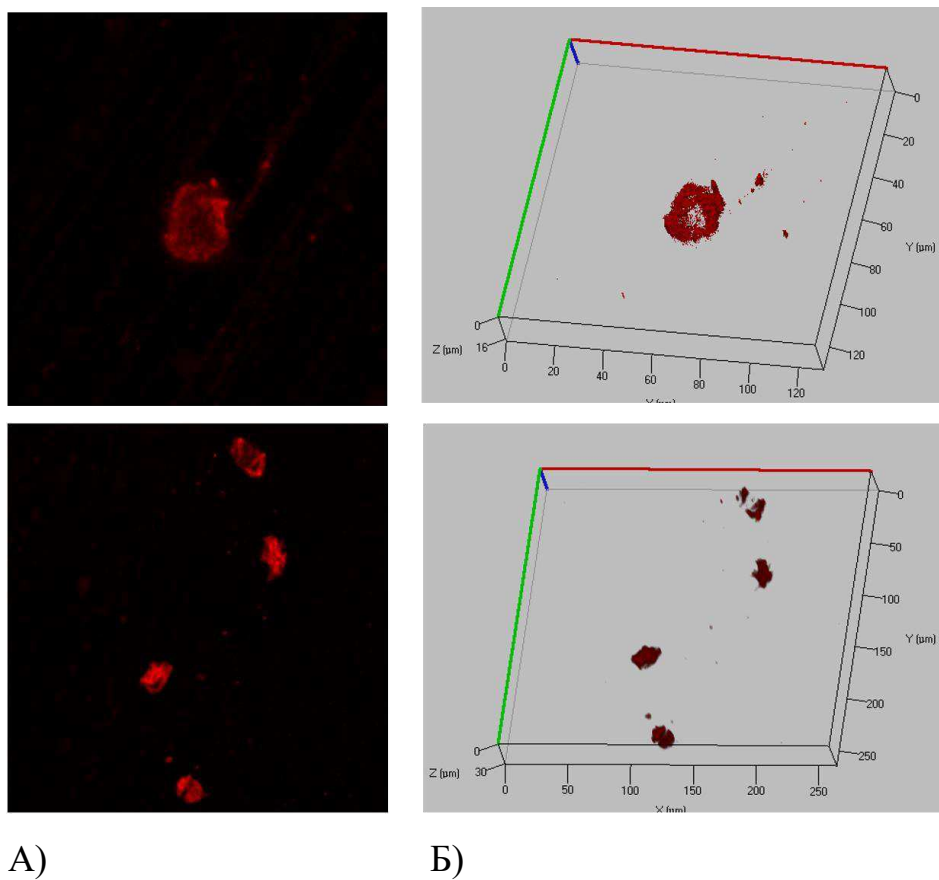


Рисунок 16 – Циркулирующие опухолевые клетки: а) окрашивание аптамером Gli-2_35 б) 3D изображение.

Для исследования внешней формы объекта, а именно циркулирующих опухолевых клеток применяли метод электронной микроскопии (рисунок 17). Полученные данные, свидетельствуют о том, что объекты, выделенные из крови больных с глиобластомой именно клетки.

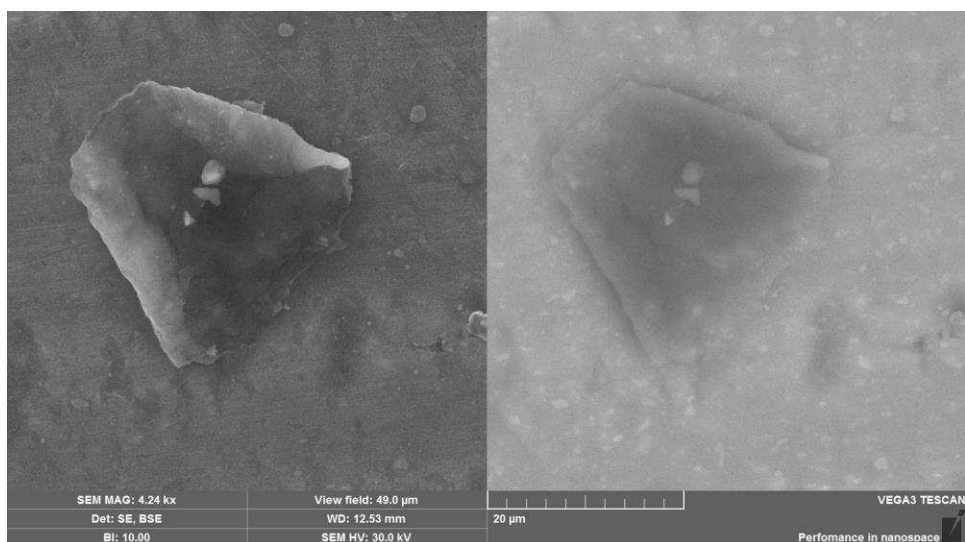


Рисунок 17 – Циркулирующая опухолевая клетка на электронном микроскопе.

На рисунке 18 представлено количество циркулирующих опухолевых клеток, микроэмбол и апоптотических телец, найденных в 4 мл крови ряда больных с глиобластомой. Данные свидетельствуют о том, что количество циркулирующих клеток для каждого пациента индивидуально, но, тем не менее, насчитывается большое количество <30 . Большое содержание опухолевых клеток в крови свидетельствует о злокачественности новообразования.

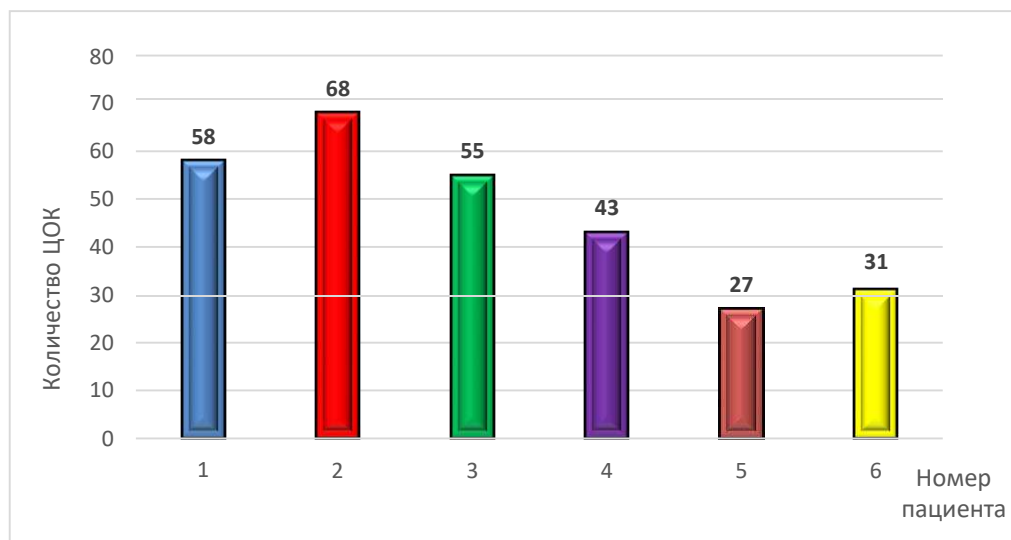


Рисунок 18 – Количество циркулирующих опухолевых клеток у разных пациентов.

Исследование содержания количества циркулирующих опухолевых клеток до и после операции, представленные на рисунке 19, выявило тенденцию повышения содержания циркулирующих опухолевых клеток после оперативного вмешательства. Данное явление, по-видимому, связано с массовым выбросом в кровь клеток опухоли во время операции.

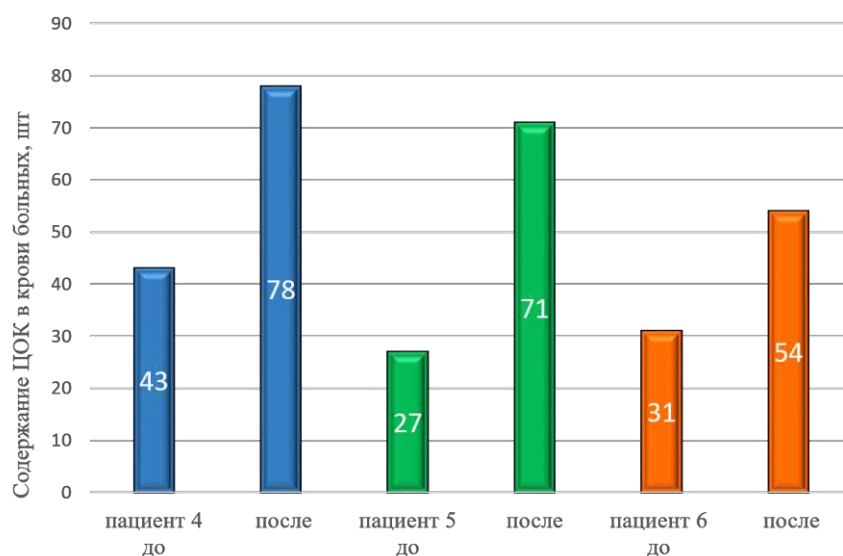


Рисунок 19 – Изменение содержания циркулирующих опухолевых клеток в зависимости от времени забора (до или после операции).

Оценка уровня циркулирующих опухолевых клеток в крови больных является перспективным методом для диагностики и мониторинга лечения глиобластомы. Благодаря окрашиванию мазков краской Романовского-Гимза при анализе с помощью флуоресцентной, световой и электронной микроскопии можно было отличать ЦОКи от форменных элементов крови, а также производить их подсчет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важной задачей медицины является разработка новых методов таргетной диагностики опухолей. Основным подход в реализации этой концепции связан с использованием высокоспецифичных молекул к заданным мишеням. Анализируя данные, полученные в работе, можно сделать следующие выводы:

1. ДНК-аптамеры способны выявлять опухолеспецифичные биомаркеры на гистологических срезах глиальных опухолей мозга человека и могут быть использованы для разработки методов дифференциальной диагностики.
2. ДНК-аптамеры к глиальным опухолям мозга, меченные флуоресцентной меткой, могут быть использованы для выявления очагов и оценки границ опухоли при хирургическом лечении, что позволит снизить риск рецидива заболевания.
3. ДНК-аптамеры способны выявлять циркулирующие опухолевые клетки и их производные (циркулирующие микроэмболы и апоптотические тельца) в крови больных с глиомой и могут быть использованы для разработки метода ранней диагностики этого заболевания.

Благодарности КГБУЗ «Красноярской межрайонной клинической больницей скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», нейрохирургу профессору А.А. Народову, Красноярскому государственному медицинскому университету имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, заведующему кафедры патологической анатомии, профессору А.К. Кириченко.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Schwartzbaum, J. Epidemiology and molecular pathology of glioma / J. Schwartzbaum, J. Fisher, K. Aldape, M. Wrensch // *Nature Clinical Practice Neurology*. – 2006. – №2. – P. 494-503.
2. Ostrom, T. Q. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review / T.Q. Ostrom, L. Bauchet, F. G. Davis, I. Deltour, J. L. Fisher, C. E. Langer, M. Pekmezci, J. A. Schwartzbaum, M. C. Turner, K. M. Walsh, M. R. Wrensch, J. S. Barnholtz-Sloan // *Neuro-Oncology*. – 2014. – V.16. – №7. – P.896–913.
3. Радько, С.П. Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики / С. П. Радько, С. Ю. Бодоев, Н. В. Рахметова, А. И. Арчаков // *Биомедицинская химия*. – 2007. – Т. 53. – С. 5-24.
4. Zhu, Y. The molecular and genetic basis of neurological tumours / Y. Zhu, L. F. Parada // *Nature Reviews Cancer*. – 2002. – №2. – P. 616-626.
5. Schrand, B. Targeting 4-1BB costimulation to the tumor stroma with bispecific aptamer conjugates enhances the therapeutic index of tumor immunotherapy / B. Schrand, A. Berezhnoy, R. Brenneman, A. Williams, A. Levay, LY. Kong, G. Rao, S. Zhou, AB. Heimberger, E. Gilboa // *Cancer Immunology Research*. – 2014. – Vol. 2. – №9. – P. 867-877.
6. Колотов, К.А. Достоверные критерии прогноза выживания больных церебральной глиомой после комбинированной терапии / К. А. Колотов // *Пермский медицинский журнал*. – 2012. – Т. 29. – №2. – С. 31-37.
7. Олюшин, В. Глиальные опухоли головного мозга: краткий обзор литературы и протокол лечения больных / В. Е. Олюшин // *Нейрохирургия*. – 2005. – № 4. – С. 41-47.
8. Chiou, S.M. Survival of brain metastasis patients treated with gamma knife surgery alone / S. M. Chiou // *Clinical neurology and neurosurgery*. – 2013. – Vol. 115. – №3. – P. 260-265.

9. Ray-Chaudhury, A. Pathology of Glioblastoma Multiforme / A. Ray-Chaudhury // Glioblastoma: Molecular mechanisms of pathogenesis and current therapeutic strategies. – 2010. – P. 77-84.
10. Moore, K. Primary brain tumor: characteristics, practical diagnostic and treatment approaches / Glioblastoma: Molecular mechanisms of pathogenesis and current therapeutic strategies. – 2010. – P. 43-73.
11. Ma, H. A dual functional fluorescent probe for glioma imaging mediated by blood-brain barrier penetration and glioma cell targeting / H. Ma, Z. Gao, P. Yu, S. Shen, Y. Liu, B. Xu // Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – V. 449. – №1. – P. 44-48.
12. Burger, P. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme / P. Burger, S. Green // Cancer. – 1987. – V. 59. – №9. – P. 1617–1625.
13. Ларькин, В. И. О скорости клеточного роста опухолей головного мозга / В.И. Ларькин, И.И. Ларькин, Ю.В. Лалов, Л.А. Ситко, В.В. Троян, Н.Н. Чигрик // Нейрохирургия и неврология детского возраста. – 2011. – №3. – С. 63-71.
14. Louis, D. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system / D. Louis, H. Ohgaki, O. Wiestler, W. Cavenee, P. Burger, A. Jouvet, B. Scheithauer, P. Kleihues // Acta Neuropathologica. – 2007. – V. 114. – №2. – P. 97-109.
15. Wanitchakool, P. Role of anoctamins in cancer and apoptosis / P. Wanitchakool, L. Wolf, G.E. Koehl, L. Sirianant, R. Schreiber, S. Kulkarni, U. Duvvuri, K. Kunzelmann // Philosophical transactions of the royal society. – 2014. – Vol. 369 – P. 1-8.
16. Gont, A. PTEN loss represses glioblastoma tumor initiating cell differentiation via inactivation of Lgl1 / A. Gont, J.E. Hanson, S.J. Lavictoire, D.A. Parolin, M. Daneshmand, I.J. Restall, M. Soucie, G. Nicholas, J. Woulfe, A. Kassam, V.F. Da Silva, I.A. Lorimer // Oncotarget. – 2013. – V. 4. – №8. – P. 1266-1279.

17. Bazzoli, E. Antiangiogenic Strategies for the Treatment of Gliomas / E. Bazzoli, A. Omuro // *Glioblastoma: Molecular mechanisms of pathogenesis and current therapeutic strategies*. – 2010. – P. 243-264.
18. Lopez-Gines, C. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile / C. Lopez-Gines, R. Gil-Benso, R. Ferrer-Luna, R. Benito, E. Serna, J. Gonzalez-Darder, V. Quilis, D. Monleon, B. Celda, M. Cerda-Nicolas // *Modern Pathology*. – 2010. – №.23. – P.856-865.
19. Li, N. Inhibition of Cell Proliferation by an Anti-EGFR Aptamer / N. Li, H. H. Nguyen, M. Byrom, A. D. Ellington // *Plos ONE*. – 2011. – V. 6. – №6. – P. 1-10.
20. Nagpal, J. Revisiting the role of p53 in primary and secondary glioblastomas / J. Nagpal, A. Jamoona, N.D. Gulati, A. Mohan, A. Braun, R. Murali, M. Jhanwar-Uniyal // *Anticancer Research*. – 2006. – V.26. – №6C. – P.4633-4639.
21. Koul, D. PTEN signaling pathways in glioblastoma / D. Koul // *Cancer Biology & Therapy* – 2008. – V.7 – №9. – P.1321-1325.
22. Kitange, G.J. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts / G. J. Kitange, B. L. Carlson, M. A. Schroeder, P. T. Grogan, J. D. Lamont, P. A. Decker, W. Wu, C. D. James, J. N. Sarkaria // *Neuro Oncology*, 2009. – V. 11. – №3. – P.281–291.
23. Hegi, M.E. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma / M. E. Hegi, A. C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller // *The new England journal of medicine*. – 2005. – V. 352. – №10. – P. 997-1003.
24. Zhang, K. The prognostic value of MGMT promoter methylation in Glioblastoma multiforme: a meta-analysis / K. Zhang, X. Q. Wang, B. Zhou, L. Zhang // *Familial Cancer*, 2013. – V. 12. – №3. – P. 449–458.

- 25.Linos, E. Atopy and Risk of Brain Tumors: A Meta-analysis / E. Linos, T. Raine, A. Alonso, D. Michaud // Journal of the national cancer institute. – 2007. – V. 99, № 20. – P. 1544-1550.
- 26.Pearce, M.S. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study / M. S. Pearce, J. A. Salotti, M. P. Little, K. McHugh, Ch. Lee, K. P. Kim, N. L. Howe, C. M. Ronckers, P. Rajaraman, A. W. Craft, L. Parker, A. B. Gonzalez // The Lancet. – 2012. – V. 380, № 9840. – P. 499-505.
- 27.Ostrom, T. Q. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review / T.Q. Ostrom, L. Bauchet, F. G. Davis, I. Deltour, J. L. Fisher, C. E. Langer, M. Pekmezci, J. A. Schwartzbaum, M. C. Turner, K. M. Walsh, M. R. Wrensch, J. S. Barnholtz-Sloan // Neuro-Oncology. – 2014. – V.16. – №7. – P.896–913.
- 28.Clarke, J. Recent advances in therapy for glioblastoma. / J. Clarke, N. Butowski, S. Chang // Archives of neurology. – 2010. – V.67. – P.279-283.
- 29.Журавлева, М.А. Использование перфузионной КТ в динамическом наблюдении за результатами комбинированного и комплексного лечения глиом головного мозга / М. А. Журавлева, А. С. Шершевер, Д. Л. Бенцион // Лучевая диагностика и терапия. – 2012. – № 2. – С. 58-64.
- 30.Pantel, K. The biology of circulating tumor cells / K. Pantel, MR. Speicher // Oncogene. – 2016. – №35. – P. 1216–1224.
- 31.Lombard, A. Glioblastoma Circulating Cells: Reality, Trap or Illusion? / A.Lombard, N. Goffart, B. Rogister // Stem Cells International. – 2015. – P. 1216–1224.
- 32.Alix-Panabieres, C. Challenges in circulating tumour cell research / C. Alix-Panabieres. K. Pantel // Nature Reviews Cancer. – 2014. – №14. – P. 623–631.
- 33.Wu, X. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo / X. Wu, H. Liang, Y. Tan, C. Yuan, S. Li, X. Li, G. Li, Y. Shi, X. Zhang // Plos One. – 2014. – V. 9. – №6. – P. 1-8.

34. Patel, D.J., Suri, A.K. Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics // *Reviews in molecular biotechnology*. – 2000. – V. 74. – P. 39-60.
35. Hu, M. The application of aptamers in cancer research: an up-to-date review / M. Hu., K. Zhang // *Future Oncology*. – 2013. – Vol. 9, – P. 369–376.
36. Радько, С.П., Бодоев, С.Ю., Рахметова, Н.В., Арчаков, А.И. Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики // *Биомедицинская химия*. – 2007. – Т. 53. – С. 5-24.
37. Mascini, M. *Aptamers in Bioanalysis* / M. Mascini // John Wiley & Sons, Hoboken. – 2009.
38. Mascini, M. Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects / M. Mascini, I. Palchetti, S. Tombelli // *Angewandte Chemie* – 2012. – V. 51. – P. 1316-1332.
39. Liu, Y. Aptamer-conjugated nanomaterials and their applications / Y. Liu, X. Zhang, M. Ye, J. Jiang, R. Yang, T. Fu, Y. Chen, K. Wang, C. Liu, W. Tan // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2011. – V. 63. – P. 1361–1370.
40. Kim, Y. Aptamers generated by Cell SELEX for biomarker discovery / Y. Kim, C. Liu, W. Tan // *Biomarkers in medicine*. – 2009. – V. 3. – №2. – P. 193-202.

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

В.И. Смирнов
подпись инициалы, фамилия

«20» июня 2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ГЛИОМЫ С ПОМОЩЬЮ
АПТАМЕРОВ**

06.04.01 Биология
06.04.01.03 Биофизика

Научный руководитель

В.И. Смирнов *проф.* *д.б.н.* *В.И. Смирнов*
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник

И.В. Гаранин
подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент

А.А. Нардуб *проф.* *д.б.н.* *А.А. Нардуб*
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2017