

Федеральное агентство научных организаций
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

№ ИНГЗ 0108-2015-0062

№ НИОКТР АААА-А16-116120810102-5

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



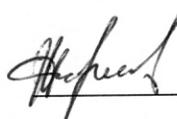
27 декабря 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Выявление характеристик протеасом опухолей щитовидной железы человека, значимых для создания новых диагностических систем и лекарственных средств, и разработка на их основе точного ускоренного метода диагностики рака щитовидной железы
(заключительный отчет)

Руководитель темы

 27.12.2017

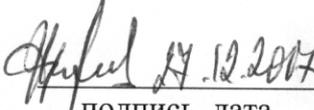
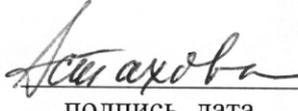
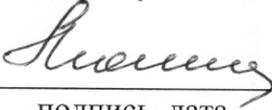
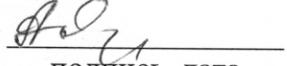
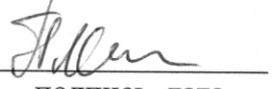
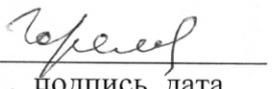
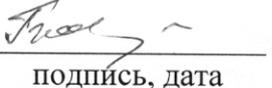
Н.П. Шарова

подпись, дата

e-mail: npsharova@bk.ru
тел. 8(926)230-39-43

Москва, 2017 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

<p>Руководитель темы, Доктор биологических наук</p>	<p> _____</p> <p>подпись, дата 24.12.17</p>	<p>Н.П. Шарова (руководство, анализ результатов, подготовка публикаций, ежегодных и итогового отчетов)</p>
<p>Исполнители темы: Кандидат биол. наук</p>	<p> _____</p> <p>подпись, дата 24.12.17</p>	<p>Т.М. Астахова (разработка метода диагностики, его апробация на 75 опухолевых образцах, исследование субъединиц протеасом опухолей)</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p> _____</p> <p>подпись, дата 27.12.17</p>	<p>Ю.В. Люпина (апробация метода диагностики на 5 опухолевых образцах)</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p> _____</p> <p>подпись, дата 27.12.17.</p>	<p>П.А. Ерохов (апробация метода диагностики на 5 опухолевых образцах, участие в исследовании субъединиц протеасом опухолей)</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p> _____</p> <p>подпись, дата 27.12.17.</p>	<p>С.Б. Абатурова (участие в разработке способов транспортировки и хранения опухолевого материала, техническом оформлении публикаций и ежегодных и итогового отчетов)</p>
<p>Кандидат биол. наук</p>	<p> _____</p> <p>подпись, дата 24.12.2017</p>	<p>А.С. Плеханова (апробация метода диагностики на 5 опухолевых образцах, подготовка публикаций)</p>
<p>Старший лаборант</p>	<p> _____</p> <p>подпись, дата 27.12.17.</p>	<p>В.С. Горелова (техническая подготовка экспериментов)</p>
<p>Старший лаборант</p>	<p> _____</p> <p>подпись, дата 27.12.17.</p>	<p>Ю.В. Богомягкова (участие в разработке способов транспортировки и хранения опухолевого материала)</p>

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Определения, обозначения и сокращения	4
Введение	5
Цель и задачи	5
Краткое содержание фактически проделанной работы и краткие формулировки полученных результатов	6
Научная и практическая значимость полученных результатов	8
Сопоставление результатов с мировым уровнем	9
Иллюстративные материалы	9
Степень выполнения поставленных задач	10
Перечень организаций-соисполнителей	10
Общее количество научных сотрудников - исполнителей (всего и отдельно академиков РАН, членов-корреспондентов РАН, докторов наук, кандидатов наук, молодых ученых (до 29 лет включительно)	10
Библиографический список основных публикаций по результатам работы по проекту	10

Реферат

Отчет 11 с., 1 таблица, 1 рисунок, 4 публикации.

Ключевые слова: злокачественные опухоли щитовидной железы, доброкачественные опухоли щитовидной железы, рак прямой кишки, химотрипсинподобная активность протеасом, каспазаподобная активность протеасом, иммунные протеасомы, диагностика рака щитовидной железы, мишени для противоопухолевого воздействия.

Разработан новый метод интраоперационной диагностики рака щитовидной железы на основе определения соотношения химотрипсинподобной (ХТП) активности протеасом в центральной области опухоли и условно нормальной ткани. Выявлены ограничения этого метода для определяемых заранее новообразований: сильно кальцинированных образцов, ХАИТа, опухолей размером $\leq 1,1$ см. Для 75 образцов злокачественных и доброкачественных опухолей, не содержащих обозначенных образцов-ограничений, точность метода составила 99%.

Выявлена мишень, общая для воздействия на злокачественные опухоли щитовидной железы и прямой кишки – иммунная субъединица LMP2 протеасом.

Определения, обозначения и сокращения:

Иммунные протеасомы – протеасомы, содержащие иммунные субъединицы LMP7 и/или LMP2 и LMP10.

ХТП активность – химотрипсинподобная активность;

КП активность – каспазаподобная активность;

ХАИТ – хронический аутоиммунный тиреоидит.

Введение

Заболеваемость раком щитовидной железы неуклонно растет во всем мире (Hundahl *et al.*, 1998; Leenhardt *et al.*, 2004; Sprague *et al.*, 2008; Jemal *et al.*, 2011). Однако в настоящее время отсутствуют надежные методы дооперационной и интраоперационной диагностики этого онкологического заболевания. Вместе с тем от правильного диагноза зависят объем хирургического вмешательства, степень травматичности и последующая инвалидизация пациентов. Общепринятый метод дооперационной диагностики новообразований щитовидной железы состоит в цитологическом исследовании материала, полученного с помощью тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии. Впоследствии дооперационный диагноз сравнивается с диагнозом, поставленным с помощью гистологического анализа послеоперационного материала.

Исследователи всего мира пришли к общему заключению о непригодности цитологического метода для дооперационной диагностики до 40% новообразований щитовидной железы (Михнин, 2007; Cooper *et al.*, 2009; Melillo, Santoro, 2012; Ward, Kloos, 2013; Xing *et al.*, 2013). При этом категория “цитологически неопределяемых” новообразований включает в себя как злокачественные, так и доброкачественные типы фолликулярной неоплазии. В связи с серьезными ограничениями применения существующего метода проблема создания нового надежного способа до- и/или интраоперационной диагностики рака щитовидной железы приобрела острый характер. Более 20 лет назад были начаты поиски молекулярных маркеров злокачественных новообразований щитовидной железы. В число исследуемых маркеров вошли фрагменты ДНК с мутациями, мРНК ряда белков, микро-РНК, белки (Михнин, 2007; Banks *et al.*, 2008; Kouniavsky, Zeiger, 2012; Xing *et al.*, 2013). Сначала возлагались большие надежды на разработку этого подхода, который сравнивали со “Святым Граалем” (Xing *et al.*, 2013).

В настоящее время поиск маркеров не завершен, хотя стало понятно, что данный подход не оправдывает ожиданий. При этом усилия многих лабораторий направлены на разработку оптимальной панели белковых маркеров, экспрессия которых в клетках пункционного материала оценивается с помощью более дешевого и доступного метода иммуноцитохимии по сравнению с методами исследования ДНК и РНК. Нами предложен принципиально иной подход к решению проблемы, который заключается в изучении и сравнении характеристик протеасом в новообразованиях щитовидной железы и условно нормальных тканях и разработке на основе полученных результатов точного метода интраоперационной диагностики рака щитовидной железы. Данный подход может быть полезен и для выявления новых мишеней среди пула протеасом опухолей щитовидной железы и, возможно, опухолей других локализаций, для разработки новых методов противоопухолевого воздействия.

Цель проекта:

Разработать точный ускоренный метод диагностики рака щитовидной железы, основанный на определении характеристик протеасом в опухоли и условно нормальной ткани в процессе операции или в пункционном материале опухоли в дооперационный период, и выявить мишени в пуле протеасом карцином щитовидной железы и, возможно, опухолей других локализаций, значимых для создания нового подхода к противоопухолевой терапии.

Задачи:

1) Разработать протокол забора, транспортировки и хранения послеоперационного материала пациентов для обеспечения достоверности результатов.

2) Собрать послеоперационный материал щитовидной железы с доброкачественными и злокачественными опухолями.

3) Разработать точный ускоренный метод интраоперационной диагностики рака щитовидной железы на основании собранного послеоперационного материала: выбрать одну из активностей протеасом и способ ее нормализации, а также области опухоли и условно нормальной ткани, наиболее значимые для точного диагностического метода; модифицировать этапы процедуры определения активности протеасом таким образом, чтобы суммарные временные затраты не превышали 20 мин., с целью применения диагностики во время проведения оперативного вмешательства.

4) Апробировать разработанный метод диагностики новообразований щитовидной железы на образцах различных злокачественных и доброкачественных новообразований.

5) Определить диапазоны значений диагностически значимого параметра для разных типов злокачественных и доброкачественных новообразований щитовидной железы.

6) Оценить точность (долю правильно поставленных диагнозов) разработанного метода диагностики новообразований щитовидной железы.

7) Описать возможные ограничения применения разработанного метода для диагностики тех или иных злокачественных и/или доброкачественных новообразований.

8) Выявить мишени в пуле протеасом карцином щитовидной железы и, возможно, опухолей других локализаций, значимых для создания нового подхода к противоопухолевой терапии.

Краткое содержание фактически проделанной работы и краткие формулировки полученных результатов

1) Разработан протокол забора, транспортировки и хранения послеоперационного материала пациентов.

2) Собран и запасен послеоперационный материал 90 образцов щитовидной железы со злокачественными опухолями и доброкачественными новообразованиями с письменного разрешения пациентов по договору о научном сотрудничестве с Городской клинической больницей № 24 Департамента здравоохранения г. Москвы

3) Разработан точный ускоренный метод интраоперационной диагностики рака щитовидной железы на основании исследования собранных образцов щитовидной железы с папиллярной карциномой без метастазирования и фолликулярной аденомой. На первом этапе выполнения этой задачи определяли и сравнивали ХТП и каспазаподобную (КП) активности протеасом в образцах, вырезанных из центральной зоны опухоли, в образцах прилежащей к опухоли ткани (на расстоянии 1 см от опухоли) и отдаленной от опухоли ткани (на расстоянии 3 см от опухоли). ХТП и КП активности определяли по гидролизу флуорогенных олигопептидов Suc-LLVY-AMC и Z-LLE-AMC, соответственно. Учитывая, что существует несколько способов нормализации активности ферментов, мы проверили три из них – нормализацию активностей протеасом на вес сырой ткани, на содержание в клетках β -актина и на 1 мг белка. Это было важно для выбора способа нормализации, наиболее точно отражающего отличие злокачественной опухоли от прилежащей или отдаленной ткани по исследуемому параметру. Данная задача была решена с использованием образцов папиллярного рака без метастазирования ($T_{1b-4a}N_0M_0$) (15 образцов) и фолликулярной аденомы (10 образцов), так как количество образцов именно этих типов злокачественных и доброкачественных опухолей было достаточным для получения достоверных результатов. Полученные результаты указывают на то, что обе активности

протеасом равноценны для характеристики фолликулярной аденомы так же, как и для характеристики папиллярного рака. Однако при выборе диагностически значимой активности протеасом мы отдали предпочтение ХТП активности, поскольку коммерческая стоимость флуорогенного субстрата для ее определения в 5-8 раз дешевле по сравнению со стоимостью субстрата для определения КП активности протеасом.

Результаты по определению диагностически значимого способа нормализации ХТП активности протеасом обобщены в Таблице 1. Оказалось, что любой способ нормализации ХТП активности протеасом отличает папиллярный рак от фолликулярной аденомы. Однако наиболее существенные отличия наблюдаются при нормализации на вес сырой ткани. При этом способе нормализации ХТП активность протеасом в фолликулярной аденоме не изменяется по отношению к условно нормальным тканям, а в папиллярной карциноме значительно увеличивается. Таким образом, мы выбрали способ нормализации ХТП активности протеасом на вес сырой ткани в качестве диагностически значимого.

При выборе диагностически значимой области папиллярной карциномы и условно нормальной ткани опирались на следующие выявленные факты. (1) ХТП активность протеасом выше в центральной области, чем в периферической области папиллярной карциномы. (2) В большинстве случаев активность протеасом одинакова в прилежащей к карциноме ткани и в отдаленной ткани. Однако у некоторых пациентов была детектирована более высокая активность в прилежащей к карциноме ткани, чем в отдаленной ткани. Поэтому в качестве диагностически значимых были выбраны центральная область опухоли и отдаленная от опухоли ткань.

На основании полученных результатов в качестве диагностически значимого показателя определен коэффициент К, отражающий отношение ХТП активности протеасом в центральной области опухоли и отдаленной ткани.

Были модифицированы этапы процедуры определения активности протеасом таким образом, что суммарные временные затраты составляют 14-18 мин., что делает данную диагностическую процедуру приемлемой при оперативном вмешательстве. Замена механического способа гомогенизации тканей на гомогенизацию ультразвуковым диспергатором, сокращение времени центрифугирования гомогенатов и времени проведения реакции гидролиза субстрата позволило уменьшить время определения активности протеасом на 50 мин без качественного изменения результата.

4) Разработанный метод диагностики рака щитовидной железы апробирован на 88 образцах пациентов, полученных с их письменного разрешения из Городской клинической больницы № 24 Департамента здравоохранения г. Москвы в 2014-2017 г.г. в рамках Договора о совместной научно-исследовательской работе. Верификация опухолей была проведена с помощью «золотого стандарта» – гистологического исследования послеоперационного материала в Городской клинической больнице № 24 и проконсультирована в Московском научно-исследовательском онкологическом Институте им. П.А. Герцена.

Выборка включала:

30 образцов папиллярного рака на стадиях $T_{1a-4a}N_{0-1b}M_0$,

19 образцов папиллярного рака фолликулярного строения на стадиях $T_{1a-4a}N_{0-1b}M_{0-1}$,

2 образца медулярного рака на стадии $T_{1b}N_0M_0$,

2 образца Гюртле-клеточного рака на стадиях $T_{1b-2}N_0M_0$,

1 образец папиллярной микрокарциномы ($D = 0,1$ см) на фоне фолликулярной аденомы,

Итого: 54 образца злокачественных опухолей,

20 образцов фолликулярной аденомы $D = 1,5-4,4$ см,

- 1 образец оксифильной аденомы из В-клеток с $D_{\max} = 1,6$ см,
- 2 образца аденоматозной гиперплазии $D_{\max} = 1,5$ см и $D_{\max} = 1,8$ см.
- 7 образцов хронического аутоиммунного тиреоидита (ХАИТ)
- 4 образца узлового коллоидного зоба,

Итого: 34 образца доброкачественных новообразований.

Следует отметить, что помимо указанных образцов, было исследовано 2 сильно кальцинированных образца рака щитовидной железы и показано, что в них технически невозможно промерить активность протеасом.

5) Диапазон значений диагностически значимого параметра – коэффициента К (отношение ХТП активности протеасом в центральной области опухоли и отдаленной от опухоли на 3 см ткани) для злокачественных опухолей составил 1,9–25,5, для доброкачественных новообразований (за исключением ХАИТ) – 0,3–1,4. Данные значения позволяют легко отличить рак от доброкачественных опухолей (Рисунок 1).

ХАИТ соответствует значениям коэффициента К в диапазоне 0,5–2,7. Верхняя граница этого диапазона перекрывается с нижней границей диапазона показателей рака. Поскольку ХАИТ легко диагностируется, применение разработанного нами метода диагностики для него не рекомендуется. Кроме того, анализ полной выборки в 88 опухолей указывает на то, что применение разработанного нами метода рекомендуется исключить для опухолей размером $\leq 1,1$ см (в них еще нет изменений активности протеасом).

6) Точность разработанного нами метода была рассчитана для совокупных 88 образцов; для этой выборки точность метода составила 91%. При исключении из общей выборки опухолей размером $\leq 1,1$ см (6 случаев) и образцов ХАИТ (7 случаев) в остаточной выборке (75 образцов) точность метода составила 99%. В этой выборке неправильно был диагностирован образец фолликулярной аденомы с включением микрокарциномы диаметром 0,1 см. Диагностика указала только на наличие аденомы.

7) Таким образом, ограничения метода распространяются на сильно кальцинированные образцы, ХАИТ, опухоли размером $\leq 1,1$ см.

Разработанный нами метод исправил/определил диагнозы неправильно диагностированных/недиагностированных с помощью тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии опухолей (в выборке 88 образцов): 10 случаев рака и 18 случаев доброкачественных новообразований. Эти результаты совпали с результатами проведенного позднее гистологического анализа («золотого стандарта»).

8) Выявлена мишень, общая для воздействия на злокачественные опухоли щитовидной железы и прямой кишки – субъединица LMP2 протеасом.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Новизна и научная и практическая значимость полученных результатов несомненна. Разработан и апробирован на 88 образцах опухолей новый интраоперационный метод диагностики рака щитовидной железы на основании определения активности протеасом, который показал 91%-ную точность. При условии исключения недиагностируемых образцов, определяемых заранее, точность метода для 75 образцов составила 99%. Выявлена новая мишень, общая для воздействия на злокачественные опухоли щитовидной железы и прямой кишки – субъединица LMP2 протеасом.

Сопоставление результатов с мировым уровнем

Разработанный подход к диагностике рака щитовидной железы и полученные результаты по значимости соответствуют мировым потребностям и мировому уровню, а по новизне его превосходят. Особенное значение разработанная диагностика имеет для небогатых регионов и клиник, где недоступно применение дорогостоящих методов, основанных на исследовании РНК.

Иллюстративные материалы

Таблица 1. Изменение ХТП активности протеасом в центральных областях опухолей щитовидной железы при разных способах нормализации

Способ нормализации ХТП активности	ХТП активность протеасом по отношению к условно нормальным тканям	
	В папиллярной карциноме	В фолликулярной аденоме
На вес сырой ткани	Увеличивается значительно (в среднем в 5 раз)	Не изменяется
На содержание β -актина	Увеличивается (в среднем в 2 раза)	Не изменяется
На 1 мг белка	Увеличивается значительно (в среднем в 8 раз)	Увеличивается (в среднем в 1,8 раз)

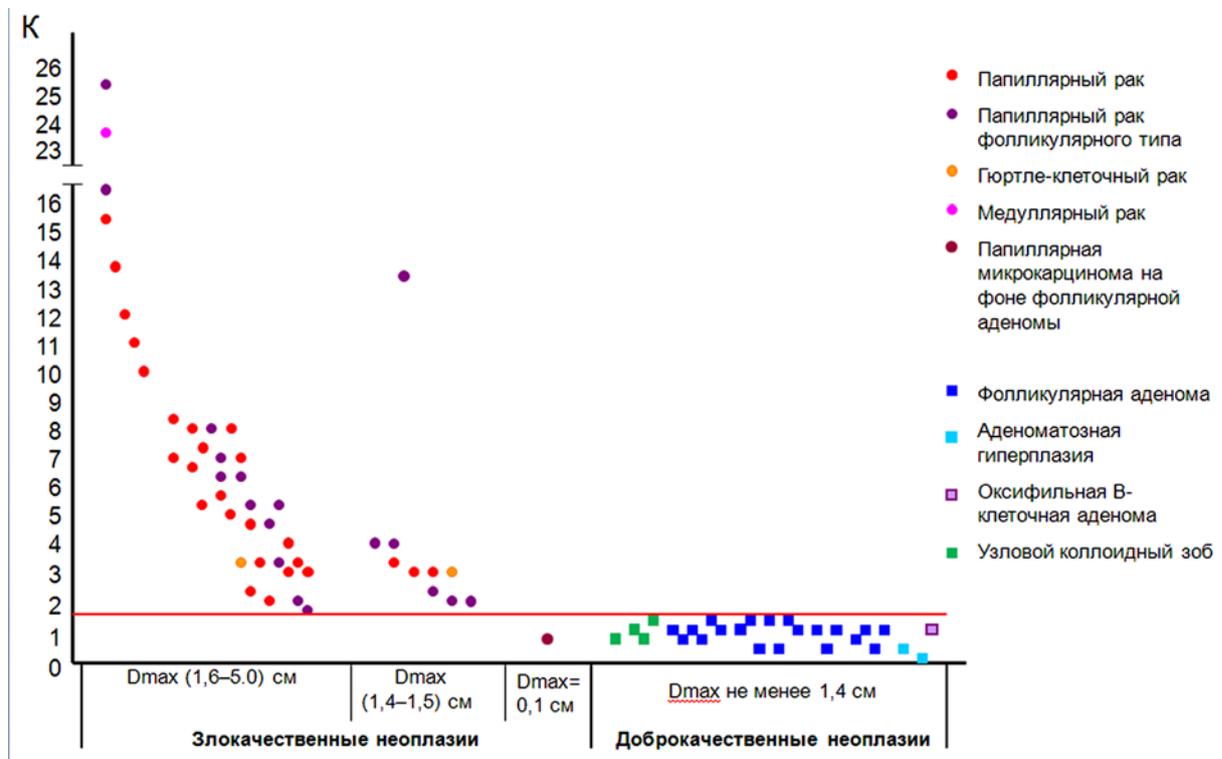


Рис.1. Значения показателя К (отношение ХТП активности протеасом в центральной области опухоли и отдаленной от опухоли на 3 см ткани) для различных злокачественных и доброкачественных неоплазий.

Степень выполнения поставленных задач

Все задачи полностью выполнены.

Перечень организаций-соисполнителей

ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава РФ, Москва,

Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения г. Москвы.

Общее количество научных сотрудников - исполнителей (всего и отдельно академиков РАН, членов-корреспондентов РАН, докторов наук, кандидатов наук, молодых ученых (до 29 лет включительно)).

Общее количество сотрудников-исполнителей: 8 человек,

Академиков – 0,

Членов-корреспондентов – 0,

Докторов наук – 1,

Кандидатов наук – 5,

Молодых ученых – 2.

Библиографический список основных публикаций по результатам работы по проекту

1) Родоман Г.В., Сумеди И.Р., Шалаева Т.И., Плеханова А.С., Шарова Н.П., Астахова Т.М. Новый тест дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей щитовидной железы // Лечебное дело. 2015. № 3. С. 72–76.

2) Шарова Н.П., Астахова Т.М., Морозов А.В., Михайловская М.И., Чупикова Н.И., Сафаров Р.Р. Разработка противоопухолевых препаратов комплексного действия на протеасомы // Acta Naturae. 2016. Спецвыпуск. Т. 2. Научные труды. С. 138.

3) Родоман Г.В., Сумеди И.Р., Шалаева Т.И., Плеханова А.С., Шарова Н.П., Астахова Т.М. Метод определения активности протеасом, модифицированный для интраоперационной диагностики неоплазий щитовидной железы // Хирург. 2016. № 8. С. 52–57.

4) Астахова Т.М., Иванова Э.В., Родоман Г.В., Сумеди И.Р., Афанасьев С.Г., Гончаров А.Л., Кондакова И.В., Шарова Н.П. Влияние неoadъювантной химиолучевой терапии на пул протеасом рака прямой кишки // Бюлл. exper. биол. мед. 2017. Т. 164. № 8. С. 220–223. (Astakhova T.M., Ivanova E.V., Rodoman G.V., Sumedi I.R., Afanas'ev S.G., Goncharov A.L., Kondakova I.V., Sharova N.P. Effect of Neoadjuvant Chemoradiation Therapy on Proteasome Pool in Rectal Cancer // Bull. Exp. Biol. Med. 2017. V. 164. No. 2. P. 191–194. DOI: 10.1007/s10517-017-3955-z.). Индексируется в системе WoS.

5) Люпина Ю.В., Становова М.В., Ерохов П.А., Абатурова С.Б., Горностаев Н.Г., Михайлов В.С., Шарова Н.П. // Роль протеасом и шаперонов в реактивности многоклеточных организмов при инфицировании вирусами и патогенами. Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. Специальный выпуск. С. 44-45. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-0

На стадии подготовки находится статья «Novel method of thyroid cancer diagnostics based on the proteasome activity detection» для опубликования в рецензируемом зарубежном издании (для опубликования требуется анализ образцов не менее 100 пациентов).

Иные достижения

1) По результатам работы 18 января 2016 г. защищена кандидатская диссертация «Новый подход к дифференциальной диагностике новообразований щитовидной железы» Плехановой А.С. на заседании диссертационного совета Д 213.203.37 при РУДН.

2) Работа по новому методу диагностики рака щитовидной железы была подана на конкурс «ОнкоБиоМед 2015» и вышла в финал.

3) Результаты работы вошли в пленарный доклад «Immune proteasomes as a factor of adaptation to genetic disorders» на международной конференции «Young biologists science week 2017», 20-25 ноября 2017 г., Петрозаводск.

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН 06 декабря 2017 г., протокол № 9.