

ОТЧЕТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ О ПРИКЛАДНЫХ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Разработка панели маркеров злокачественной трансформации предстательной железы для проведения ранней неинвазивной диагностики заболевания

по теме:

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО- БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ЭТАП 1

Соглашение о субсидии от «23» сентября 2014 г. № 14.607.21.0068

в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

Научный руководитель,

чл.-корр. РАН

В.М. Говорун

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от «23» сентября 2014 г. № № 14.607.21.0068 с Минобрнауки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014- 2020 годы» на этапе № 1 в период с 23 сентября 2014 г. по 31 декабря 2014 г. выполнялись следующие работы:

1. Аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно техническую проблему исследования молекулярно-биологических признаков трансформации клеток предстательной железы.

2. Проведение патентных исследований по ГОСТ 15.011-96 .

3. Выбор основных направлений исследования, включающий теоретическое определение потенциальных биомаркеров заболевания, согласно современным данным о патогенезе рака предстательной железы.

4. Разработка методов выделения и анализа нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и белков, полученных из биологических образцов сыворотки крови и мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома и рак простаты, а также группы контроля без патологии предстательной железы.

5. Разработка методов анализа потенциальных биомаркеров заболевания с применением культур клеток рака простаты DU145, NLCap PC-3.

6. Разработка набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот, получаемых из опухолевого, гиперплазированного и неизмененного материала тканей предстательной железы пациентов с раком простаты.

7. Разработка процедуры пробоподготовки образцов сыворотки крови и/или мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля.

8. Разработка требований к группе контроля, включающей здоровых пациентов и/или иных лиц.

9. Сбор образцов сыворотки крови и мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля.

ПНИ «Разработка панели маркеров злокачественной трансформации предстательной железы для проведения ранней неинвазивной диагностики заболевания» в целом направлена на решение актуальной проблемы современной медицины, а именно – разработку биомаркерной панели для ранней диагностики злокачественной трансформации предстательной железы. Имеющиеся в настоящее время в мире диагностические решения обладают недостаточной специфичностью, в РФ же реализован только тест для детекции сывороточного уровня ПСА – самый неспецифичный из всех мировых тестов.

Целью этапа 1 ПНИ является проведение подготовительных мероприятий для последующей разработки панели биомаркеров злокачественной трансформации предстательной железы для проведения ранней неинвазивной диагностики заболевания.

При этом были получены следующие результаты:

1. Выполнен аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему исследования молекулярно-биологических признаков трансформации клеток предстательной железы.

Анализ источников официальных регуляторов и профессиональных сообществ показал, что рекомендованными к использованию в клинической практике перед биопсией является только тест на ПСА сыворотки и пальцевое ректальное исследование простаты. Однако разрешённым к использованию в некоторых странах является и тест ПСА3. В сетевых лабораториях и передовых медучреждениях в качестве тестовых используются анализы более чем на 15 биомаркеров при диагностике рака простаты, а исследования последних лет предлагают использование и профиля метилирования ДНК, а

опухоль-ассоциированные антигены, и метаболом/ протеом как опухолевой ткани, так и сыворотки/ мочи пациента.

Анализ рекомендаций и стандартов лечения злокачественной трансформации предстательной железы показал значительное сходство в подходах к диагностике в РФ и за рубежом в связи с использованием в качестве базовых рекомендации европейской ассоциации урологов. В мире уже разработаны сложные сигнатуры, использующие экспрессионные панели маркеров для диагностики и выработки прогноза протекания рака предстательной железы. Однако в нашей стране отсутствует в виде предложения даже одобренный за рубежом тест ПСА3, не говоря уже о дополнительных экспериментальных биомаркерах. Таким образом, представляется обоснованной и возможной технологически разработка панели биомаркеров для ранней диагностики рака простаты, позволяющая увеличить специфичность и чувствительность диагностики до первичной биопсии.

2. Проведены патентные исследования по ГОСТ 15.011-96 с целью определения технического уровня используемых подходов и тенденций развития в области диагностических маркеров злокачественной трансформации внутренних органов, в частности – предстательной железы, для проведения ранней неинвазивной диагностики заболевания; и определения технологического уровня современных тест-систем маркеров злокачественной трансформации внутренних органов, в частности – предстательной железы, для проведения ранней неинвазивной диагностики заболевания на основе длинных некодирующих РНК.

В результате проведенного в соответствии с заданием патентного поиска по определению технического уровня используемых подходов и тенденций развития в области диагностических маркеров злокачественной трансформации внутренних органов идентичного решения, предполагаемого к разработке в рамках ПНИ «Разработка панели маркеров злокачественной трансформации предстательной железы для проведения ранней неинвазивной диагностики заболевания», найдено не было. В рассмотренных информационных источниках был предложен ряд прогностических и предиктивных биомаркеров, в том числе РНК-маркеров, пептидов, и однонуклеотидных полиморфизмов. Однако простого в обращении диагностического метода с высокими показателями чувствительности и специфичности предложено не было.

В результате проведения патентного исследования был определен технический уровень используемых подходов и тенденций развития в области диагностических маркеров злокачественной трансформации внутренних органов в полном соответствии с утвержденным заданием. Было установлено, что большинством существующих

изобретений используют либо белковые биомаркеры, сложные в обнаружении с помощью дорогостоящих систем для масс-спектрометрии, либо детекцию однонуклеотидных полиморфизмов, имеющих потенциал для определения риска заболевания, но совершенно бесполезных для сверхранней диагностики.

Использование результатов патентных исследований по определению технического уровня используемых подходов и тенденций развития в области диагностических маркеров злокачественной трансформации предстательной железы для проведения ранней неинвазивной диагностики заболевания будет в дальнейшем выполнено в целях создания нового типа диагностической панели для раннего обнаружения злокачественных трансформаций предстательной железы.

3. Выбраны основные направления исследования, включая теоретическое определение потенциальных биомаркеров заболевания, согласно современным данным о патогенезе рака предстательной железы.

- а) Разработка методов выделения РНК, ДНК и белков из биологических образцов для последующего анализа.
- б) Формирование первичного набора маркеров из литературных источников и/или баз данных.
- в) Выявление взаимосвязи между составом соматических мутаций, протеомом и транскриптомом простаты, наличием некодирующей РНК в моче и сыворотке крови.
- г) Экспериментальная верификация первичной панели маркеров.
- д) Проверка валидности кандидатов и формирование кандидатных маркеров тест-системы.
- е) Разработка макета диагностической тест системы на основе выявленных целевых биомаркеров.

4. Разработаны методы выделения и анализа нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) и белков, полученных из биологических образцов сыворотки крови и мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома и рак простаты, а также группы контроля без патологии предстательной железы.

Проведена апробация различных методик выделения ДНК и РНК из сыворотки крови, сравнение их эффективности. Так же были опробованы методы выделения белка сыворотки крови. За основу были взяты 2 основных метода экстракции - метанол-хлороформный метод и метод осаждения белка растворами кислот. Оба метода имеют

свои преимущества и недостатки. Так метод метанол-хлороформной экстракции не позволяет получить спектр белков, ассоциированных с липидами, так как в данном случае липиды вместе с белками удаляются на одном из этапов экстракции. Метод осаждения белка кислотами не имеет подобного недостатка, а в полученном экстракте могут быть представлены различные белки, в том числе липопротеины и ассоциированные с липидами белки. Метод является нетрудоемким, и заключается в добавлении к объему сыворотки до 10% объема трихлоруксусной кислоты. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа, производится центрифугирование и получение осадка белка, который затем промывается раствором холодного ацетона. Далее полученный осадок растворяется в 50 мМ NH_4HCO_3 . В данной работе было произведено сравнение методов выделения по количественному выходу белка. 4 мл сыворотки 3 образцов, поделенные на 2 равные порции, были использованы для выделения белка двумя методами. Полученные осадки были растворены в 100 мкл 50 мМ NH_4HCO_3 , а концентрации белка измерены с применением реактива Брэдфорда. Все измерения выполнены в трех технических повторах.

Выделение белков методом осаждения позволяет получить больше белка, нежели метод метанол-хлороформной экстракции. Стоит отметить, что последующие этапы подготовки белка к масс-спектрометрическому анализу сопряжены с получением фракций минорных компонентов, что влечет за собой потери концентрации белка. В этой связи, метод осаждения белка кислотами взят за основу как высокопроизводительный и воспроизводимый.

5. Разработаны методы анализа потенциальных биомаркеров заболевания с применением культур клеток рака простаты DU145, LNCaP и PC-3.

Для анализа геномных данных был использован сет данных GEO GSE38674, в котором был результат полногеномного секвенирования для клеточной линии LNCaP. Риды были получены в формате SRA (исходный для секвенатора Illumina) и получены со страницы <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE38674>. Далее они были конвертированы в fastq программой fastq-dump пакета sratoolkit 2.3.1. Полученный fastq был собран пакетом BWA с использованием генома hg19. Полученный bam файл был отсортирован по порядку хромосом и проиндексирован. Далее программой mpileup из пакета samtools были определены точки, в которых есть отклонения от референса с условием: число ридов с другой аллелью в данной точке не менее 10 штук. Остальные параметры были выставлены для фильтрации ошибок секвенатора. Порог по качеству был выбран 10. После выделения списка точек была определена соматичность или

наследуемость этой мутации в зависимости от наличия или отсутствия ридов с другими нуклеотидами. Если количество ридов с некоторой аллелью превышает 40% от общего числа ридов (если их две) или 60% если вариант один, то это наследственная гетерозигота и гомозигота соответственно. Если же количество ридов менее 40%, но более 5%, то скорее всего это соматическая мутация.

При анализе нефилтрованных результатов секвенирования было обнаружено 1050 отличий от референса для 525 уникальных позиций, из них более, чем в 70 позициях встречались 3 или 4 варианта нуклеотидов. 702 мутации находились в 138 генах, при этом для 45 из них отсутствует идентификатор базы данных dbSNP. Статус соматической был условно присвоен 63 мутациям из 32 генов, при этом сразу несколько мутаций было обнаружено в генах WASF2, HIVEP3 и DAB1. При этом ген DAB1 ранее уже был включён в список потенциальных маркеров, а гены WASF2 и HIVEP3 ранее не отмечались как маркерные.

6. Разработан набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот, получаемых из опухолевого, гиперплазированного и неизмененного материала тканей предстательной железы пациентов с раком простаты.

Произведена оценка количества выделенной РНК из 3 образцов ткани простаты человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Концентрация РНК была рассчитана по стандарту ДНК в диапазоне 20-200 нг/мкл.

Состав набора реагентов для выделения РНК выглядит следующим образом:

№	Название компонента набора	Состав компонента
1	Денатурирующий раствор	4.5М гуанидин тиоцианат; 0.3М ацетат натрия; фенол насыщенный 1:1
2	Хлороформ	Хлороформ
3	Отмывочный раствор №1	100% изопропанол
4	Дистиллированная вода	Дистиллированная вода свободная от РНКаз

7. Разработана процедура пробоподготовки образцов сыворотки крови и/или мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля.

В ходе выполнения работ по отчётному периоду были разработаны детальные протоколы пробоподготовки образцов мочи для исследования как пациентов с

верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля. Протоколы являются универсальными для пробоподготовки вышеуказанных типов образцов, вне зависимости от принадлежности пациента к любой клинической группе. Протоколы по пробоподготовке сыворотки крови в связи с распространением «вакутейнеров» являются более универсальными и не требуют специальной подготовки.

В связи с тем, что одноразовые капсулы занимают намного меньше места и совместимы с любым контейнером для сбора мочи, в исходный протокол пробоподготовки были добавлены пункты о добавлении консерванта из одноразовых капсул при необходимости длительного хранения мочи.

Осадок, полученный центрифугированием мочи, представляет собой осадок клеток, их обломков и крупных мембранных везикул, так как нуклеиновые кислоты содержатся преимущественно в интактных клетках (ДНК, РНК) и крупных везикулах (РНК), то стабилизаторы ДНК/РНК для клеток являются подходящими стабилизаторами для осадка мочи.

Исходя из практики исследовательской деятельности и медицинских процедур, в пробоподготовке мочи до выделения ДНК и/или РНК можно выделить 2 временных периода:

- а) период от забора мочи после массажа простаты до получения осадка,
- б) период от получения осадка до выделения ДНК и/или РНК.

Разработаны 3 протокола пробоподготовки мочи и 1 протокол пробоподготовки сыворотки взят готовым, так как является стандартным в НИИ ФХМ для проведения любых исследований.

8. Разработаны требования к группе контроля, включающей здоровых пациентов и/или иных лиц.

В подавляющем большинстве случаев (90-97%) присутствие островков злокачественного роста в простате не приводит к выраженной клинической манифестации, т.е. заболевание, если таковое и имеется, характеризуется индолентным течением. Таким образом, очевидным препятствием для всех эпидемиологических, скрининговых, хирургических и терапевтических исследований является явный конфликт между морфологическим диагнозом и клинической сутью происходящего. Критической проблемой онкологической урологии представляется неспособность выделить ту небольшую пропорцию мужчин, у которых присутствие островков малигнизации в ткани предстательной железы является угрозой для здоровья. Поэтому при разработке тестов для ранней диагностики злокачественного перерождения предстательной железы, группой

контроля, по сути, могут являться не только пациенты, у которых патоморфологически не выявлен рак простаты, но и пациенты с ранним клинически незначимым раком простаты. При этом в соответствии с рекомендациями европейской ассоциации урологов, для пациентов группы контроля, у которых патоморфологически не был подтверждён рак предстательной железы, должны иметь следующие показатели ПСА крови:

> 1,4 нг/мл у мужчин до 60 лет (чувствительность - 0,74; специфичность - 0,79)

> 2,1 нг/мл у мужчин \geq 60 лет (чувствительность - 0,68; специфичность - 0,70) [21].

Таким образом, были предъявлены следующие требования к контрольной группе:

а) Возраст – от 40 до 90 лет,

б) Отсутствие тяжёлых патологий, например, хронической почечной недостаточности, хронической обструктивной болезни лёгких, печёночной недостаточности, сосудистых патологий головного мозга, декомпенсированного сахарного диабета, тяжёлых сердечных и сосудистых патологий и т.д.,

в) Отсутствие адьювантной, брахи- и радиотерапии в период не позднее 10 лет с момента включения в исследование,

г) Исключение приёма цитостатиков и/или цитотоксиков как во время исследования, так и в период не менее 1 года до включения в исследование,

д) Отсутствие мутаций в генах BRCA1, BRCA2 и отсутствие мутаций в рамке считывания PCAT19,

е) Наличие результатов генотипирования генов AR и CYP17A1,

ж) Наличие одного из патоморфологических оснований для включения в группу контроля:

1) в биопсии не обнаружено признаков злокачественного перерождения, и биоптаты не отправлены на перепроверку, дополнительные инструментальные методы обследования не обнаруживают подозрительных узлов, кист или новообразований в отдалённых от простаты очагах,

2) в биопсии обнаружены признаки злокачественного перерождения, но клиническое наблюдение не менее 3-х лет показало их клиническую незначимость,

3) имеется установленный диагноз рак простаты.

з) Уровень ПСА не ниже уровня отсечки для данного возраста.

9. Выполнение сбора образцов сыворотки крови и мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля.

На хранение в НИИ ФХМ была заложена Коллекция биоматериала 100 пациентов с верифицированным диагнозом рак простаты, в том числе 28 с верифицированным диагнозом «ранний рак простаты» в составе 253 образцов, из них 100 образцов сыворотки крови и\или цельной крови, 53 образца мочи, 100 образцов ткани простаты.

Также была заложена на хранение коллекция биоматериала 100 пациентов группы контроля, в том числе 87 пациентов с верифицированным диагнозом аденома простаты (доброкачественная гиперплазия простаты) в составе 257 образцов, из них 100 образцов сыворотки крови и\или цельной крови, 57 образцов мочи, 100 образцов ткани простаты. Образцы каждого испытуемого заложены на хранение в отдельном пакете в морозильной камере при температуре -80°C .

10. Материально-техническое обеспечение экспериментальных работ этапа 1.

Проведение экспериментальных работ в части разработки методов анализа потенциальных биомаркеров и разработки наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот потребовало задействования научного оборудования и использования дополнительных реактивов, которые были приобретены за внебюджетные средства.

11. Проведение научно-образовательных мероприятий.

В течение этапа 1 в целях реализации научно-образовательных задач был проведен Симпозиум 8 «Персональная медицина» в рамках Четвертой Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», которая прошла с 29 октября по 1 ноября 2014 года в г.Казань.

12. Проведение маркетинговых исследований по тематике российского рынка молекулярной диагностики человека.

Маркетинговое исследование рынка молекулярной диагностики человека было проведено в целях изучения потенциала инновационной продукции, потребностей компаний реального сектора в потенциальных и существующих инновациях в области услуг и методов молекулярной диагностики человека за счет внебюджетных средств Индустриального партнера ООО Лаборатория «Литех».

В результате исследования сделан вывод, что в настоящее время на рынке существуют конкурирующие диагностические решения, такие как: PSA (простат специфический антиген), [-2]proPSA, PCA3 (антиген рака простаты 3), Proteomedix (комплекс пептидных простат специфических антигенов), которые отличаются одним или несколькими недостатками, такими как: требования специального лабораторного

оборудования для проведения анализа, особыми требованиями к квалификации медицинского персонала, высокой стоимости реактивов, низкими показателями чувствительности и/или специфичности диагностического теста, инвазивностью анализа. Таким образом, актуальной становится задача создания неинвазивной диагностической тест-системы для выполнения анализа на стандартном лабораторном оборудовании, при минимальных требованиях к квалификации медицинского персонала.

Исследование российского рынка молекулярной диагностики человека позволило говорить о наличии рыночной ниши указанного теста – аналога РСА3 объёмом не менее 35 млн. рублей, и линейки неинвазивных тестов на основе количественного анализа уровня экспрессии некодирующих РНК для диагностики онкологических заболеваний в объёме не менее 850 млн. рублей.