**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

# Pеферат

Наукової роботи

**“Молекулярно-генетичні та клінічні дослідження пост-Чорнобильського та спорадичного папілярного раку щитоподібної залози”**

**Дінець Андрій Володимирович** – кандидат медичних наук, начальник науково-дослідної частини, асистент кафедри хірургії №4 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

**Вступ**

Наукова робота складається з 5 розділів, що опубліковані у закінченій формі у вигляді наукових праць. Наукові праці опубліковані в рецензованих міжнародних журналах англійською мовою, українських журналах, у вигляді тез міжнародних та українських конференцій, патентів України на корисну модель, розділу навчального посібника. Наукова робота виконана в рамках спільного наукового проекту між Національним медичним університетом імені О.О. Богомольця та Каролінським Інститутом (Швеція).

 **Загальна характеристика публікацій**

 Наукова робота налічує 22 друкованих праць: 5 статей у міжнародних рецензованих журналах з імпакт фактором >0, 7 статей у фахових журналах ДАК МОН України, 7 тез, 2 патенти України на корисну модель, 1 навчальний посібник.

 Загальна кількість посилань в Scopus на публікації автора – 82 (з яких 73 – по представленій науковій роботі); індекс Гірша автора за Scopus = 5, за Google Scholar = 6.

 У міжнародних журналах з імпакт-фактором >3 опубліковано 5 статей:

* European Journal of Endocrinology (офіційний журнал Європейської асоціації ендокринологів, імпакт-фактор 3.8) – 2 статті
* Thyroid (офіційний журнал Американської тиреоїдної асоціації, імпакт-фактор 3.8) – 1 стаття
* PLoS One (імпакт-фактор 3.7) – 1 стаття
* Oncogene (Nature Publishing Group, імпакт-фактор 7.9), – 1 стаття

**Актуальність роботи**

Папілярний рак щитоподібної залози (ПРЩ) – це високодиференційована злоякісна пухлина, що походить з фолікулярних клітин. ПРЩ є найпоширенішим злоякісним новоутворенням, частка якого становить >80% серед інших злоякісних новоутворень щитоподібної залози. Спорадичний ПРЩ діагностується переважно у жінок та рідко у дітей, тоді як радіаційно-індукований ПРЩ може визначатись в усіх вікових групах. Аварія на Чорнобильській атомній електростанції (ЧАЕС) у 1986 році призвела до радіоактивного забруднення значних територій в Європі різними ізотопами, у т.ч. радіоактивним йодомю. При захопленні щитоподібною залозою це спричиняє її ураження її генетичного апарату, а потім призводить до розвитку ПРЩ, особливо у дітей.

Слід зазначити, що кілька десятиліть після аварії на ЧАЕС сталась аварія на Фукусімській АЕС в Японії, у результаті чого знову постала проблема питання радіаційного опромінення і ризику злоякісних пухлин щитоподібної залози. Аварія на Фукусімській АЕС – нова демонстрація того, що ядерна нестабільнісь можлива і в наші дні, тому радіаційно-індуковані пухлини залишаються актуальним напрямком досліджень.

Пост-Чорнобильський ПРЩ був і залишається найкращим доступним клінічним матеріалом для фундаментальних досліджень впливу радіоактивного опромінення на щитоподібну залозу.

Одним з наслідків аварії на ЧАЕС стало значне зростання захворюваності на ПРЩ серед дитячого населення. У цієї когорти пацієнтів ПРЩ був згодом класифікований як пост-Чорнобильський ПРЩ, який широко досліджений в Українських та в закордонних науково-дослідних установах. І хоча аварія на ЧАЕС трапилась більше ніж 30 років тому, наслідки цієї катастрофи спостерігаються і дотепер – у дорослих пацієнтів, які були дітьми (вік < 18 років) на момент аварії на ЧАЕС та проживали на радіоактивно забрудненій території відзначається підвищена частота діагностування ПРЩ.

Як зазначалось, хірургічне лікування та молекулярно-генетичні зміни в пост-Чорнобильських ПРЩ у *дитячого населення* широко досліджені та висвітлені в науковій літературі. Проте клінічні та молекулярно-генетичні зміни ПРЩ у *дорослих* пацієнтів, які були дітьми на момент аварії на ЧАЕС та проживали на радіоактивно-забрудненій території України, але у яких ПРЩ був діагностований у дорослому віці, не досліджувались. Визначення особливостей клінічного перебігу та молекулярно-генетичних змін у таких пацієнтів є актуальним, оскільки це дозволить виявити біологічно-агресивні пухлини, покращити передопераційну діагностику та хірургічне лікування цих пацієнтів. Визначення таких особливостей може бути використано в рутинній клінічній практиці в усьому світі, враховуючи можливі ризики ядерної нестабільності, як продемонстровано на прикладі аварії не тільки на ЧАЕС, але і Фукусімської АЕС в Японії.

Іншим дискусійним та остаточно невирішеним питанням в дослідженнях злоякісних пухлин щитоподібної залози є діагностика ПРЩ на доопераційному етапі. Рутинна діагностика ПРЩ базується на даних тонкоголкової аспіраційної пункційної біопсії (ТАПБ), що є “золотим стандартом” в усьому світі, в т.ч. Україні, для оцінки підозрілого на малігнізацію вузлового утворення щитоподібної залози в клініці ендокринної хірургії. Проте, цитологічний діагноз ПРЩ *неможливо* встановити у випадку неінформативної ТАПБ, що трапляється в 10-15% випадків, або малоінформативної ТАПБ, що не дозволяє диференціювати ПРЩ від фолікулярної аденоми щитоподібною залози. Також проблемним є передопераційна діагностика кістозного ПРЩ – злоякісної пухлини, що діагностується у 4-13% пацієнтів та є класичним за патогістологічною будовою ПРЩ, але визначається як вузлове утворення на стінці кісти щитоподібної залози. При виконанні ТАПБ такого новоутворення часто отримують кістозну рідину в аспіраті, що містить недостатню для інформативного цитологічного заключення кількість фолікулярних клітин щитоподібної залози.

У зв’язку з цим, важливим завданням сучасної ендокринної хірургії та ендокринної патанатомії є ідентифікація молекулярних маркерів злоякісних пухлин щитопобідної залози, що можливо лише при виконанні фундаментальних досліджень. Такі молекулярні маркери можуть стати додатковим до ТАПБ інструментом в передопераційній діагностиці ПРЩ, фолікулярного раку щитоподібної залози та інших злоякісних новоутворень щитоподібної залози. Ідентифікація потенційних маркерів ПРЩ може бути здійснена за допомогою визначення та порівняння протеомного профілю ПРЩ з ішими пухлинами щитоподібної залози або нормальною тканиною цього органу. Незважаючи на значне підвищення чутливості та зростаюче розширення діапазону визначення протеїнів за допомогою мас-спектрометрії, ідентифікація передопераційних маркерів ПРЩ залишається актуальним напрямком наукових досліджень в ендокринній хірургії. Слід зазначити, що протеомні дослідження ПРЩ проводять використовуючи екстракти протеїнів з тканини або аспірованих клітин, проте дослідження протеому кістозної рідини як потенційного субстрату для діагностики ПРЩ з застосуванням мас-спектрометрії не проводились.

 Таким чином дослідження пост-Чорнобильського ПРЩ у дорослих пацієнтів, що були дітьми на момент аварії на ЧАЕС та зазнали радіоактивного ураження, є актуальною проблемою фундаментальних досліджень, вирішення якої дозволить визначати молекулярно-генетичні особливості радіаційно-індукованих карцином та їх зв’язок з клінічними параметрами та виявити біологічно-агресивні пухлини. Ідентифікація передопераційних маркерів ПРЩ для діагностики цієї злоякісної пухлини на доопераційному етапі є актуальним у світі напрямком фундаментальних досліджень, результати яких дозволять вирішити проблему ранньої діагностики ПРЩ та інших злоякісних пухлин, проведення хірургічного лікування на початкових стадіях злоякісного процесу, уникнути проведення відкритої (інцизійної) біопсії при не- або малоінформативній ТАПБ.

 **Мета роботи**

 Ідентифікувати молекулярно-генетичні зміни у пост-Чорнобильському (радіаційно-індукованому) та спорадичному ПРЩ та визначити діагностичну та прогостичну роль цих змін; визначити та верифікувати перспективні для передопераційної діагностики протеїни-маркери ПРЩ.

 **Наукова новизна**

 *Розділ 1*

 В науковій роботі було ідентифіковано та досліджено унікальний клінічний матеріал пост-Чорнобильського ПРЩ, діагностованого у дорослих пацієнтів в Україні, які отримали опромінення внаслідок аварії на ЧАЕС в дитячому віці. Проведено аналіз цього архівного матеріалу (тканина ПРЩ, що фіксована в формальдегіді та заключна у парафіновий блок): було виконано виділення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), секвенування ДНК, Піросеквенування; виділення рибонуклеїнової кислоти (РНК) з подальшим синтезом комплементарної ДНКдля проведенняПЛР в реальному часі з використанням ДНК-зондів TaqMan; флюоресцентна *in situ* гібридизація (FISH); імуногістохімія (ІГХ) була проведена на зрізах тканини з парафінового блоку, які також були підверглись патоморфологічному аналізу після форбування гематоксиліном та еозином. Статистична обробка результатів проведена ліцензійним програмним забезпеченням з застосуванням непараметричних методів.

 Результати молекулярно-генетичних досліджень були проаналізовані в контексті патоморфологічних змін пост-Чорнобильського ПРЩ, діагностованого у дорослих пацієнтів, які отримали опромінення внаслідок аварії на ЧАЕС в дитячому віці. Для визначення мутації в 15 екзоні гена *BRAF* (*BRAF* 1799Т>A) було ізольовано ДНК та застосовано Піросеквенування. За результатами аналізу пірограм, було визначено 26 (37%) випадків з *BRAF* 1799Т>A мутацією. Подальший аналіз когорти показав, що *BRAF* 1799Т>A мутація в 3.5 разів рідше визначалась в випадках ПРЩ на фоні хронічного лейкоцитарного тиреоїдиту (ХЛТ), у порівнянні з ПРЩ без супутньої тиреоїдної патології, відповідно у 12% (2/16) та 44% (24/54) випадків (p < 0.05). За допомогою ПЛР в реальному часі були ідентифіковні 20 (29%) випадків з хромосомними перестановками *RET/PTC1* та 4 (6%) випадків з *RET/PTC3*. Поєднання *BRAF* 1799T>A мутації з *RET/PTC* було визначено в 4 (6%) випадків. Подальший аналіз отриманих результатів показав достовірно низьку пропорцію випадків *BRAF* 1799T>A мутацій у пацієнтів (12%), в яких ПРЩ був виявлений на фоні ХЛТ у порівнянні з 44% випадками ПРЩ (р < 0.05). Враховуючи асоціацію *BRAF* 1799Т>A мутації з агресивним фенотипом ПРЩ, відсутність цієї генетичної аномалії при ПРЩ на фоні ХЛТ може опосередковано свідчити про кращий прогноз для пацієнтів, у яких ПРЩ визначається на фоні ХЛТ.

 Визначення хромосомних перестановок *RET*/*PTC1* та *RET*/*PTC3* було виконано за допомогою ПЛР в реальному часі з використанням ДНК-зондів TaqMan. Аналіз даних ПЛР виявив переважання випадків з *RET*/*PTC1 –* 29% (20/70)*,* у порівнянні з 6% (4/70) *RET*/*PTC3*. Ці результати дещо відрізняються від даних досліджень *дитячих* пост-Чорнобильських ПРЩ, де визначаються переважно *RET*/*PTC3.* Проте, слід враховувати, що наявність цих генетичних аномалій часто позитивно корелює з патогістологічним типом ПРЩ: *RET*/*PTC1* визначається в ПРЩ з класичним типом та дифузно-склеротичному варіанті (переважно у дорослих), а *RET*/*PTC3* в солідному фолікулярному типі (діагностується переважно у дітей).

 Проліферація ПРЩ оцінювалась за індексом МІВ-1, що характеризує експресію маркера проліферації Кі-67. Більше того, було враховано потенційно наявні проліферуючи лімфоцити у випдках ПРЩ на фоні ХЛТ, що могло призвести до отримання хибнопозитивного індексу МІВ-1. З метою уникнення хибнопозитивного результату було виконано ІГХ з використанням LCA-антитіл та МІВ-1 одночасно, що дозволило відокремити проліферуючі лімфоцити від клітин ПРЩ під час аналізу ІГХ слайдів. Завдяки такому підходу, індекс МІВ-1 був визначений на рівні 0.8%, що на 0.7% менше у порівнянні з даним оцінки ІГХ за умови відсутності LCA-антитіл. Індекс МІВ-1 на рівні 0.8% не корелював з клінічним показниками.

 Оцінка програмованої клітинної смерті проводилась за допомогою визначення експресії BCL-2, що є одним з регуляторів апоптозу. Була визначена позитивна експресія цього протеїну в 53 (75%) випадків ПРЩ. Також була визначена позитивна кореляція між експресією BCL-2 та *BRAF* 1799Т>A мутацією (r = 0.24, p<0.05).

 Оцінка регулятора клітинного циклу цикліну А проводилась за допомогою імуногістохімії. Циклін А був досліджений з урахуванням даних про його дерегуляцію в низько-диференційованій та недефренційованій карциномах щитоподібної залози, що свідчить про його можливу роль в де-диференціації пухлин щитоподібної залози. Аналіз імуногістохімії та клінічних параметрів досліджуваної когорти показав достовірний вдвічі вищий рівень експресії цикліну А в випадках ПРЩ ≥ 2 cм (1.2%), у порівнянні з ПРЩ < 2 см в найбільшому діаметрі (0.6%), p < 0.05. Отримані результати свідчать про можливу прогностичну роль цикліну А в радіаційно-індукованих ПРЩ. При проведенні кореляційного аналізу було визначено позитивну кореляцію між експресією цикліну А та індексом МІВ-1 (r = 0.38, p < 0.05).

 Інший регулятор клітинного циклу циклін D1 був оцінений в пост-Чорнобильському ПРЩ за допомогою імуногістохімії та методу FISH. При аналізі даних імуногістохімії враховувалась лише нуклеарна експресія протеїну. Було ідентифіковано позитивну експресію цикліну D1 в 68 (97%) випадках ПРЩ. Подальший аналіз даних показав позитивну кореляцію експресії цикліну D1 з цикліном А (r = 0.39, p < 0.05), а також з індексом проліферації МІВ-1 (r = 0.34, p < 0.05); також було визначено негативний кореляційний зв’язок з *RET/PTC1* (r = -0.26, p<0.05). Аналіз FISH слайдів не виявив ампліфікацій гену, що не корелювало з даними імуногістохімії та може свідчити про дерегуляцію цикліну D1 на транскрипційному, трансляційному або пост-трансляційному рівнях регуляції експресії білка.

 В цій науковій роботі, таким чином, було верифіковано роль радіоактивного опромінення як фактору ризику розвитку ПРЩ більше, ніж через 25 років після аварії на ЧАЕС.

 *Розділ 2*

 В цьому розділі наукової роботи для ідентифікації молекулярних маркерів злоякісних пухлин щитоподібної залози було застосовано кількісні методи (мас-спектометрію SELDI-TOF-MS, Вестерн блот) для аналізу префракаційованих екстрактів протеїнів для порівняння протеомного профілю нормальної тканини щитоподібної залози з високо-диференційованими карциномами щитоподібної залози, в т.ч. ПРЩ.

 У пацієнтів з ПРЩ за допомогою SELDI-TOF мас-спектрометрії було виконано протеомний аналіз цитозольних фракцій протеїнів, виділених з досліджуваних заморожених зразків пухлин щитоподібної залози. При аналізі даних SELDI-TOF-MS було виявлено 155 пік-кластерів. При подальшому аналізі був ідентифікований мас-пік з m/z 10.2 кДа, посилена експресія якого була достовірно вища в ПРЩ, у порівнняні з фолікулярним раком щитоподібної залози, фолікулярною аденомою щитоподбіної залози та нормальною тканиною щитоподбіної залози (p < 0.05). Цей мас-пік з m/z 10.2 кДа був визначений як протеїн S100A6, що було підтверджено за допомогою імунозахоплення, при якому застосовувались специфічні до S100A6 антитіла. Також, одними з першими дослідженнями в цій області були продемостровані цистеїнова та глутатіонова пост-трансляційні модифікації S100A6 в ПРЩ за допомогою імунопреципітації з подальшим застосуванням мас-спектрометрії LC-MS/MS. За домогомою Вестерн блоту, визначено та підтверджено наявність одного бенда з молекулярною масою 10 кДа в усіх досліджених зразках ПРЩ та в позитивному контролі (екстракт протеїнів з лінії клітин раку легень А549). Подальше сканування знімків та денситометрія бендів протеїнів показали достовірну вищу експресію S100A6 в ПРЩ у порівнняні з нормальною тканиною щитоподібної залози (p = 0.001), з фолікулярною аденомою щитоподбіної залози (p = 0.019), фолікулярним раком щитоподібної залози (p = 0.012).

 Імуногістохімічним аналізом верифіковано дані SELDI-TOF-MS та Вестерн блоту: визначено середньо-сильний рівень експресії в S100A6 в цитозолі зразків ПРЩ, у порівнянні з фолікулярними пухлинами (p = 0.004). Імуноекспресія S100A6 була також визначена в зразках пост-Чорнобильського ПРЩ, де позитивний сильний сигнал був визначений в 63 (90%) зразках.

 Також в досліджуваних зразках були проаналізовані мутації в екзоні 11 (1406G>C) та 15 (1799T>A) гену *BRAF* за допомогою прямого секвенування геномної ДНК. Аналіз виконано для визначення можливого зв’язку між посиленою експресією S100A6 та молекулярною аномалією сигнального шляху BRAF, що часто діагностується в ПРЩ. *BRAF* 1799T>A мутація була ідентифікована в 50% ПРЩ, проте достовірної різниці між досліджуваними групами за цим параметром визначено не було.

 *Розділ 3*

 За допомогою 2-DE таMALDI-TOF мас-спектрометрії виконано протеомий аналіз фолікулярних пухлин щитоподібної залози для ідентифікації потенційних передопераційних діагностичних маркерів для пар пухлин: ПРЩ та фолікулярний рак щитоподібної залози (ФРЩ), а також фолікулярна аденома щитоподбіної залози (ФАЩ) та ФРЩ.

 Було досліджено цитозольні фракції протеїнів з зразків пухлин щитоподібної залози, досліджувались з використанням 2-DE гелю, при аналізі якого було ідентифіковано 800 протеїнових плям. На основі даних мультиваріантного PLS-DA аналізу цих плям були побудовані 2 предиктивні моделі ПРЩ-ФРЩ та ФАЩ-ФРЩ. З 800 ідентифікованих протеїнів, до предиктивної моделі ФАЩ-ФРЩ було включено 25 протеїнових плям, а до ПРЩ-ФРЩ – 19 протеїнових плям (збагаються з плямами в моделі ФАЩ-ФРЩ).

 Виконано мас-спектрометрію MALDI-TOF-MS, що дозволило ідентифікувати індивідувальні протеїни, що формували кожну з досліджуваних протеїнових плям. Проведено аналіз даних MALDI-TOF-MS та виявило 9 протеїнів – потенційних кандидатів на роль діагностичного маркера: протеїн 14-3-3 (ізоформи β/α, ζ/δ та ε), пероксиредоксин 6 (PRX6), аннексин А5 (АNXA5), селен-зв’язуючий протеїн 1 (SELENBP1), протеїн дисульфід-ізомерази (PDIp), α-1В ланцюг тубуліну (TUBA1B), а також попередник α1-антитрипсину (А1Т1).

 Визначена предиктивна потужність 9 протеїнів в моделях ПРЩ-ФРЩ та ФАЩ-ФРЩ та визначено достатній для подальшої верифікації рівень в кожній моделі. Експресія протеїнів, що відповідали 9 вибраним протеїновим плямам з 2-DE гелю була верифікована за допомогою Вестерн блоту, дані якого показали різні рівні експресії в досліджуваних моделях. Також для верифікації даних було проведено імуногістохімію для визначення експресії протеїнів 14-3-3 (ізоформи β, ζ, ε) та ANXA5, враховуючи дані Вестерн блоту.

 Визначено позитивну цитоплазматичну експресію протеїну 14-3-3 в зразках пухлин та позитивного контролю. В клітинах досліджуваних пухлин позитивна експресія визначалась в 80% зразків ПРЩ, 33% зразків ФАЩ, 67% зразків ФРЩ. АNXA5 також показав позитивну цитоплазматичну експресію в усіх досліджуваних зразках ПРЩ та ФАЩ, а також в 89% ФРЩ. Також було проаналізовано імнуноекспресію 14-3-3 та ANXA5 в 70 зразках пост-Чорнобильського ПРЩ.

 За допомогою імуногістохімії виявлено рівні від слабкого до сильного типу експресії 14-3-3, з позитивними та негативними ділянками в ПРЩ на фоні хронічного лімфоцитарного тиреоїдиту (ХЛТ). За допомогою імуногістохімії виявлено рівні протеїну ANXA5 від слабкого до сильного типу експресії в 50-100% клітин ПРЩ, при цьому лімфоцити в ПРЩ на фоні ХЛТ були негативними.

 Одними з першими нами було продемонстовано достовірно різні рівні експресії протеїнів, що увійшли до досліджуваних моделей доброякісних пухлин щитоподібної залози ПРЩ з ФРЩ.

 *Розділ 4*

 В науковій роботі також було визначено роль гену, що кодує зворотню полімеразу транскриптази (TERT) для злоякісної трансформації клітин щітоподібної залози.

 Було оцінено роль мутації промотора *TERT* 228C>T і промотора *TERT* 250C>T в пост-Чорнобильському ПРЩ, анапластичному раку щитоподібної залози, медулярному раку щитоподібної залози за допомогою прямого секвенування ДНК. Секвенування було проведено для 10 ліній клітин пухлини щитоподібної залози, 144 зразків пухлин, що отримані від 20 пацієнтів з анапластичною карциномою щитоподібної залози, 51 зразків пост-Чорнобильського ПРЩ, 36 зразків фолікулярної карциноми щитоподібної залози, і 37 зразків медулярної карциноми.

 Було визначено мутації промотора *TERT* 228C>T і промотора *TERT* 250C>T в лінії клітин анапластичного раку щитоподібної залози (АРЩ), а також в видаленій тканині карцином AРЩ, ПРЩ, ФРЩ і МРЩ.

 Одними з першими, в цьому дослідженні було визначено, що у пацієнтів, мутації промотора *TERT* 228C>T і промотора *TERT* 250C>T були виключно присутні в групі віком 45 років (p<0.0001) і сильно корельовані з коротшою довжиною теломери (p<0.0001), а також ризиком віддалених метастазів (р=0.028).

 На зразках пост-Чорнобильского ПРЩ було визначено, що мутації промотора *TERT* 228C>T і промотора *TERT* 250C>T не корелюють з радіоактивним опроміненням.

 Були визначено, що мутації промотора *TERT* 228C>T і промотора *TERT* 250C>T є незалежним прогностичним фактором, що пов’язаний з більш коротким виживанням пацієнтів без ознак прогресії захворювання.

 Було доведено, що мутації промотора *TERT* 228C>T і промотора *TERT* 250C>T часто зустрічаються в раку щитовидної залози, що походить з фолікулярних клітин (ПРЩ, ФРЩ, АРЩ), але не в МРЩ, що походить з парафолікулярних (С-) клітин.

 *Розділ 5*

 В науковій роботі вперше проведено протеомний аналіз кістозної рідини, що акумулюється доброякісними кістами щитоподібної залози та кістозним папілярним раком щитоподібної залози за допомогою мас-спектрометрії LC-MS/MS.

Були визначені потенційні діагностичні маркери кістозного ПРЩ за допомогою протеомного аналізу рідини, аспірованої з доброякісних та злоякісних кіст щитоподібної залози.

Протеомний аналіз був виконаний за допомогою LC-MS/MS мас-спектрометрії та виявивено 1581 протеїнів, серед яких 841 містили мітки iTRAQ в обох пулах. Застосовуючи метод аналізу OPLS, було створено достовірну високопредиктивну модель з 59 протеїнів (р = 0.0027). Ці 59 протеїнів були проаналізовані за допомогою ІРА, що дозволило ідентифікувати основні сигнальні шляхи для протеїнів, що відрізняють кістозний ПРЩ від доброякісних кістозних утворень щитоподібної залози.

Вперше для кістозного ПРЩ були достовірно визначені сигнальні шляхи: убіквітинація протеїнів, зовнішня активація протромбіну, внутрішня активація протромбіну, коагуляційна система, глюконеогенез (р < 0.01).

Враховуючи дані LC-MS/MS, кількість пептидів та величину показника достовірності для подальшого аналізу та верифікації за допомогою імуногістохімії та Вестерн блоту були вибрані протеїни: цитокератин 19 (CK-19), протеїн S100A13, аннексин А3 (ANXA3) та гомолог карбоксиметилебутенолідази (CMBL). Додатково, до цього аналізу був включений протеїн HBME-1 – загальноприйнятий в рутинній клінічній практиці післяопераційний маркер ПРЩ.

В тканині кістозного ПРЩ було проаналізовано експресію СК-19, що показав середньо-сильний імуносигнал в 100% клітин в усіх зразках кістозного ПРЩ, тоді як контрольні зразки були негативні (р < 0.05). Аналіз HBME-1 показав вищий рівень експресії в в усіх зразках кістозного ПРЩ у порівнянні з доброякісним контролем, демоструючи лише декілька позитивних клітин з слабким імуносигналом (р < 0.05).

За допомогою LC-MS/MS було доведено роль СК-19 в канцерогенезі *кістозного* ПРЩ.

Аналіз імуногістохімії з S100A13, CMBL та ANXA3 показав однакові рівні імуноекспресії в усіх досліджуваних зразказ кістозного ПРЩ та доброякісному контролі. Більше того, було визначено позитивну експресію S100A13, CMBL та ANXA3 в гістологічно нормальних фолікулярних клітинах щитоподібної залози, що оточували ПРЩ.

 В науковій роботі виконано аналіз рідини кістозного ПРЩ за допомогою Вестерн блоту та виявлено слабкий імуносигнал в бендах S100A13 в 4 (57%) кістозних ПРЩ, тоді як в інших кістозних ПРЩ та всіх зразках доброякісного контролю експресія S100A13 не була визначена.

 **Практична значимість**

Зміни на молекулярному рівні відіграють важливу роль в канцерогенезі ПРЩ та корелюють з несприятиливими клінічними характеристиками цієї злоякісної пухлини, що впливає на результати лікування пацієнтів. Розуміння того, як ці зміни пов’язані з канцерогенезом на фундаментальному рівні є важливим елементом ідентифікації нових та інформативних передопераційних діагностичних та прогностичних маркерів, а також розробки нових терапевтичних агентів.

 Враховуючи наявність ризиків радіоактивних катастроф в наші дні, зокрема аварії на Першій Фукусімській атомній електростанції (Японія), результати досліджень пост-Чорнобильського ПРЩ у дорослих дозволять в майбутньому покращити результати діагностики та хірургічного лікування пацієнтів, що постраждали внаслідок подібних катастроф.

Виявлений в результаті протеомного аналізу протеїн S100A6 показав достовірно високий рівень експресії в ПРЩ, що може бути застосовано для передопераційної верифікації діагнозу цього злоякісного новоутворення та дозволить зменшити кількість відкритих біопсій при малоінформативній тонкоголковій аспіраційній пункційній біопсії. Інші виявлені протеїни в ході протеомного дослідження ПРЩ, фолікулярних неоплазій щитоподібної залози та нормальної тканини ЩЗ є потенційними кандидатами на роль діагностичних маркерів раку ЩЗ.

 Ідентифіковані протеїни СК-19 та S100A13, що акумулюються доброякісними та злоякісним кістозними утвореннями щитоподібної залози можуть бути визначені та застосовані як додаковий до тонкоголкової аспіраційної пункційної біопсії тест для передопераційної верифікації діагнозу кістозного ПРЩ при малоінформативній біопсії.

**Автор роботи, к.м.н. А.В. Дінець**