



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120859** (13) **U**  
(51) МПК

**G01N 33/493** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2017 04274**

(22) Дата подання заявки: **28.04.2017**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **27.11.2017**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **27.11.2017, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Мицик Юліан Олегович (UA),  
Досенко Віктор Євгенович (UA),  
Борис Юрій Богданович (UA),  
Чернова Наталія Вікторівна (UA),  
Мицик Олег Іллів (UA)**

(73) Власник(и):

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА  
ГАЛИЦЬКОГО,  
вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)**

**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ НИРКОВО-КЛІТИННОГО РАКУ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО БІОМАРКЕРА МІКРОРНК-15a В СЕЧІ**

(57) Реферат:

Спосіб діагностики нирково-клітинного раку за допомогою молекулярного біомаркера включає визначення експресії генетичного молекулярного біомаркера. Додатково проводять виділення РНК, зворотну транскрипцію та полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі для визначення експресії молекулярного біомаркера мікроРНК-15a в сечі. За отриманими показниками проводять діагностику нирково-клітинного раку і визначають ступінь диференціації пухлини.

**UA 120859 U**



Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема урології, і може бути застосована для підвищення точності діагностики нирково-клітинного раку.

Нирково-клітинний рак (НКТ) є найбільш розповсюдженою первинною пухлиною нирки, що зустрічається у 3 % випадків всіх злоякісних новоутворень і у 90 % випадків злоякісних пухлин нирки [Pierorazio Phillip M., Michael H. et al. Management of Renal Masses and Localized Renal Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. The Journal of Urology. № 4. Vol. 196. 2016. P. 989-99].

Ефективність застосування черезшкірних пункційних біопсій (ЧПБ) для діагностики НКТ на даний момент активно дискутується, оскільки дана методика є інвазивною, а частка неінформативних ЧПБ нирки варіюється від 5 до 40 % [Blute Michael, Joel Prince, Eric Bultman et al. Predictors of non-diagnostic renal mass biopsy. The Journal of Urology. 2015. № 4. Vol.193. P. 532-533]. Водночас, чутливість променевих методів обстеження, таких, як комп'ютерна томографія чи магнітно-резонансна томографія у діагностиці цієї патології не перевищує 86-96 %, а достовірна диференціація НКТ та доброякісних пухлин нирки - онкоцитом, папілярної аденоми та ангіоміоліпому з низьким вмістом жиру - взагалі неможлива [Zhang Hanmei, Qi Gan, Yinghua Wu et al. Diagnostic Performance of Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging in Differentiating Human Renal Lesions (Benignity or Malignancy): A Meta-Analysis. Abdominal Radiology. N10. Vol. 41. 2016. P. 1997-2010]. Особливі труднощі виникають при постановці діагнозу у хворих з малими нирковими новоутворами (SRM, small renal masses) розмірами до 4 см, при яких, як вказують результати післяопераційного патоморфологічного аналізу, 7,5-33,6 % парціальних нефректомій при підозрі на злоякісний процес виконуються за наявності доброякісної пухлини нирки [Kim See Hyung, Chan Sun Kim, MiJeong Kim et al. Differentiation of Clear Cell Renal Cell Carcinoma From Other Subtypes and Fat-Poor Angiomyolipoma by Use of Quantitative Enhancement Measurement During Three-Phase MDCT. American Journal of Roentgenology. N1. Vol. 206. 2016. P. 21-28]. На даний момент активно вивчається роль мікроРНК (miR) у розвитку злоякісних пухлин та можливість їх застосування у якості біомаркерів раку методом вивчення їх експресії у тканинах та рідинах хворих. В останні роки було проведено ряд досліджень по вивченню експресії мікроРНК при НКТ. Було визначено, що середнє значення експресії мікроРНК-508-3р в крові хворих із НКТ є достовірно нижчим, ніж у хворих із доброякісними пухлинами нирок та у здорових осіб: 7,33 умовних одиниць (УО), 22,27 УО та 23,15 УО відповідно [Строй О.О., Банира О.Б., Шуляк О.В. Цінність Мікро-РНК-508-3р у діагностиці раку нирки. Український Медичний Часопис. № 2. 2012. С. 1-3]. В інших дослідженнях були наведені дані щодо абнормальної експресії окремих мікроРНК у хворих із НКТ, а саме miR-27, miR-28, miR-30c, miR-106b, miR-135a, miR-141, miR-185, miR-199a, miR-200c, miR-210, miR-451, miR let-7f-2, проте отримані результати нерідко взаємно суперечать, а рівні експресії мікроРНК інколи виміряні лише в тканинах пухлини вже після її видалення [Vergho Daniel, Susanne Kneitz, Andreas Rosenwald et al. Combination of Expression Levels of miR-21 and miR-126 Is Associated with Cancer-Specific Survival in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. BMC Cancer. 2014. N14 (25). P. 1-10]. На сьогоднішній день, згідно з Рекомендаціями Європейської Асоціації Урології, не існує жодного молекулярного біомаркера, який би міг застосовуватись у широкій клінічній діагностичній практиці при вказаній патології. Існують дані щодо важливого значення miR-15a у патогенезі раку простати, хронічної лімфоцитарної лімфоми та аденоми гіпофізу, при яких вона відіграє роль туморосупресора, промотуючи апоптоз злоякісних клітин, маючи за мішень онкоген BCL2. MiR-15a походить з кластеру хромосомної ділянки 13q14, яка часто делетована при злоякісних новоутвореннях [Teixeira Ana L., Marta Ferreira, Joana Silva et al. Higher Circulating Expression Levels of miR-221 Associated with Poor Overall Survival in Renal Cell Carcinoma Patients. Tumour Biology. N5 (35). 2014. P. 4057-66].

У даний момент не виникає сумніву у необхідності пошуку молекулярних біомаркерів нирково-клітинного раку, визначення яких би дозволяло без інвазивного втручання проводити діагностику цього захворювання, встановлювати гістологічний підтип та ступінь диференціації пухлини і при цьому уникати променевого навантаження на хворого.

Найближчим аналогом пропонованої корисної моделі є спосіб діагностики і лікування злоякісної пухлини з використанням антитіла проти EREG шляхом визначення підвищеної експресії гена і білку EREG при раку нирки та інших злоякісних пухлинах - раку товстого кишечника, аденокарциноми легень, раку підшлункової залози та раку шлунка [Патент РФ № 2537245 С2, МПК А61К 39/395, А61Р 35/00, опубл. 27.12.2014].

Спільною ознакою найближчого аналога та корисної моделі, що заявляється, є те, що в обох випадках проводять визначення експресії генетичного молекулярного біомаркера, на основі визначення рівню якого проводять діагностику НКТ. Проте, найближчий аналог дозволяє

визначати експресію EREG лише в отриманих зразках тканини, для чого необхідне інвазивне втручання - ЧПБ, та не передбачає визначення ступеня диференціації пухлини.

В основу корисної моделі поставлена задача створити неінвазивний спосіб діагностики нирково-клітинного раку за допомогою молекулярного біомаркера мікроРНК (міРНК), що дозволить оцінити його експресію в хворих із НКР, а також визначати ступінь диференціації зл�якісного процесу.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі діагностики нирково-клітинного раку за допомогою молекулярного біомаркера, що включає визначення експресії генетичного молекулярного біомаркера, згідно з корисною моделлю, проводять виділення РНК, зворотну транскрипцію та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) у реальному часі для визначення експресії молекулярного біомаркера міРНК-15а в сечі та за отриманими показниками проводять діагностику НКР і визначають ступінь диференціації пухлини.

Заявлена корисна модель базується на дослідженні, яке дозволяє вперше неінвазивним методом за допомогою зворотної транскрипції та ПЛР проводити визначення експресії молекулярного біомаркера мікроРНК-15а в сечі хворих із підозрою на НКР, диференціювати зл�якісні і доброякісні пухлини нирок та встановлювати ступінь диференціації нирково-клітинного раку за класифікацією Furrhman.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

У хворого із НКР за 1 день до нефректомії та на 8-й день після неї в стерильний контейнер збирають ранішню сечу в об'ємі 100-150 мл, при потребі - з подальшою кріоконсервацією при -25 °С.

Визначення експресії міРНК-15а у сечі проводять в декілька етапів. Виділяють тотальну РНК за допомогою набору mirVana™ miRNAIsolationKit (AppliedBiosystems, США) у відповідності до протоколу виробника. Визначають концентрацію РНК із використанням спектрофотометра (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies Inc, США). Проводять визначення мікроРНК методом зворотної транскрипції та ПЛР у реальному часі: зворотну транскрипцію виконують, застосовуючи набір TaqManMicroRNAReverseTranscriptionKit (AppliedBiosystems, США), специфічний праймер для мікроРНК та 10 нг тотальної РНК; кількість ПЛР у реальному часі проводять з використанням TaqManMicroRNAAssays (AppliedBiosystems, США): U6 snRNA, ID 001973 (як ендогенний контроль), hsa-miR-15a, ID 000389 (AppliedBiosystems, США). Температурні цикли наступні: крок ініціальної денатурації 95 °С 10 хв.; 50 циклів 95 °С-15 с та 60 °С-60 с. Рівень експресії міРНК нормалізують до U6 snRNA, представлений в умовних одиницях ( $2^{-\Delta C_{t \times 100}}$ , УО). Ампліфікацію проводять на "7500 FastReal-time PCR" (AppliedBiosystems, США). Отримані результати аналізують за допомогою програмного забезпечення "7500 FastReal-time PCR", відображення результатів - за допомогою графіків.

Отримані рівні експресії міРНК-15а у хворих із підозрою на НКР дозволяють проводити диференційну діагностику зл�якісного процесу шляхом порівняння значення експресії із її референтним значенням у здорових осіб, а також у хворих із доброякісними пухлинами нирок: у хворих із НКР рівні експресії міРНК-15а достовірно вищі ( $p < 0,01$ ).

Для створення способу та підтвердження його ефективності проводили дослідження (на базі кафедри урології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та Відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України) у дорослих хворих із нирково-клітинним раком, віком від 46 до 69 років, середній вік складав  $60,19 \pm 6,36$  року. Контрольну групу склали здорові волонтери без ниркової патології за даними клінічних та променевих досліджень віком від 47 до 55 років (середній вік  $53,5 \pm 4,9$  року).

Отримані у ході дослідження дані свідчать, що середнє значення експресії міРНК-15а в сечі хворих із НКР є значно ( $p < 0,01$ ) вищим у порівнянні з таким у пацієнтів із доброякісними пухлинами нирок та у здорових осіб:  $2,50E-01 \pm 2,72E-01$  УО проти  $1,32E-03 \pm 3,90E-03$  УО проти  $3,36E-07 \pm 1,04E-07$  УО відповідно. При цьому аналіз середніх значень експресії міРНК-15а у хворих із НКР до та після оперативного втручання продемонстрував статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) його зниження в післяопераційному періоді на 99,53 %. Спостерігалась статистично достовірна різниця значень експресії міРНК-15а між НКР із високим (ступені за Furrhman I та II) та низьким (ступені за Furrhman III та IV) ступенем диференціації ( $p < 0,05$ ). Визначені у процесі дослідження показники міРНК-15а представлені у таблиці.

Таблиця

Експресія міРНК-15а в сечі у хворих із НКР, доброякісними пухлинами нирки та у здорових осіб

Тип пухлини/ підгрупа хворих	N	Середнє арифм.	Медіана	Станд. відх.	95 % довірчий інтервал для середнього арифметичного		Мін.	Макс.
					Нижня межа	Верхня межа		
НКР до операції	52	2,50E-01*	1,27E-01	2,72E-01	1,74E-01	3,25E-01	5,17E-06	9,93E-01
НКР після операції	52	1,18E-03*	5,36E-04	5,18E-03	2,61E-04	2,63E-03	3,26E-06	3,78E-02
Світлоклітинний НКР	22	3,00E-01	2,28E-01	3,06E-01	1,64E-01	4,36E-01	9,56E-06	9,93E-01
Папілярний НКР	16	1,77E-01	7,81E-02	2,33E-01	5,29E-02	3,02E-01	8,25E-06	8,21E-01
Хромобластний НКР	14	2,53E-01	1,91E-01	2,54E-01	1,07E-01	4,00E-01	5,17E-06	7,13E-01
Світлоклітинний НКР високої диференціації	12	8,28E-02**	1,76E-02	1,44E-01	8,80E-03	1,74E-01	9,56E-06	4,25E-01
Світлоклітинний НКР низької диференціації	10	5,61E-01**	5,57E-01	2,33E-01	3,94E-01	7,27E-01	1,28E-01	9,93E-01
НКР і некрозом	9	6,13E-01	5,86E-01	2,15E-01	4,48E-01	7,79E-01	2,35E-01	9,93E-01
НКР без некрозу	43	1,74E-01	5,43E-02	2,16E-01	1,07E-01	2,40E-01	5,17E-06	7,25E-01
Доброякісні пухлини	15	1,32E-03*	7,34E-06	3,90E-03	8,40E-04	3,49E-03	5,28E-06	1,46E-02
Норма	15	3,36E-07*	3,28E-07	1,04E-07	2,79E-07	3,94E-07	1,60E-07	5,27E-07

Примітки: \*статистична різниця при порівнянні між всіма підгрупами становить  $p < 0,01$ ;

\*\* статистична різниця при порівнянні між всіма підгрупами становить  $p < 0,05$ .

Отримані результати свідчать про те, що визначення у сечі експресії міРНК-15а може застосовуватись як біомаркер НКР для діагностики цього захворювання та визначення ступеня диференціації пухлини.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики нирково-клітинного раку за допомогою молекулярного біомаркера, що включає визначення експресії генетичного молекулярного біомаркера, який **відрізняється** тим, що проводять виділення РНК, зворотну транскрипцію та полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі для визначення експресії молекулярного біомаркера мікроРНК-15а в сечі та за отриманими показниками проводять діагностику нирково-клітинного раку і визначають ступінь диференціації пухлини.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601