



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114653** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
A61B 5/00
G01N 33/569 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 10425	(72) Винахідник(и): Телегєєв Геннадій Дмитрович (UA), Дибков Михайло Васильович (UA), Швачко Людмила Павлівна (UA), Лисецька Тетяна Юріївна (UA), Поліщук Лев Олександрович (UA), Стаховський Едуард Олександрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.10.2016	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.03.2017	(74) Представник: Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.03.2017, Бюл.№ 5	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ МЕТАСТАТИЧНОЇ АГРЕСИВНОСТІ КАРЦИНОМИ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ СПЕЦИФІЧНИХ ПРАЙМЕРІВ ПЛР

(57) Реферат:

Спосіб визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР в якому із зразка сечі хворого, отриманого після масажу простати, виділяють ДНК, виділяють РНК та синтезують до неї кДНК, проводять двоетапну кількісну ПЛР з використанням специфічних праймерів на першому етапі - **t_{erg}-2F - AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG**, **t_{erg}-1R - TCTGGAAGGCCATATTCTTTTCAC** на другому етапі - **t_{erg}-2F - AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG**, **t_{erg}-2R - TAACTCTGCGCTCGTTCGTG** до маркера-1 - кДНК гена *tmprss2/erg*, проводять метил-специфічну ПЛР з використанням специфічних праймерів **GSTP1F 5'-GATTTGGGAAAG AGGGAAAGG-3'**, **GSTP1R 5'-CTAAAACTCTAAACCCCATCC-3'**, позитивний контроль: **F 5'-GGTAAAGATAAAATAGGAGATGTGT-3'**, до маркера-2 - ДНК гена *GSTP1*, проводять кількісну ПЛР з використанням специфічних праймерів **CXCR4F 5'GGCCCTCAAGACCACAGTCA3'**, **CXCR4R 5'TTAGCTGGAGTGAAAACCTGAAG3'**, позитивний контроль: **Ia bcr f - AAATGTTGGAGATCTGCCTGAAG**, **Ib bcr f - TTATCAAAGGAGCAGGGAAGAAG**, **P190-R - TTGACTGGCGTGATGTAGTTGC** до маркера-3 - кДНК гена *CXCR4*. Проводять електрофорез в агарозному гелі та за результатами електрофорезу роблять висновок про метастатичну агресивність раку передміхурової залози.

UA 114653 U

Пропонована корисна модель належить до галузі біотехнології та молекулярної біології і може бути використана зокрема для визначення метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози, а більш конкретно до способу визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР.

Відомі молекулярно-генетичні діагностичні маркери, такі як спосіб визначення промоторного метилювання гена GSTP11 [Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage. / Roupert M, Hupertan V, Yates DR, Catto JW, Rehman I, Meuth M, Ricci S, Lacave R, Cancel-Tassin G, de la Taille A, Rozet F, Cathelineau X, Vallancien G, Hamdy FC, Cussenot O. // Clin Cancer Res. - 2007. - 13. - P. 1720-1725.]; спосіб визначення злиття *tmprss2/erg* [DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. / Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debmyne FM, Ru N, Isaacs WB. // Cancer Res. - 1999. - 59(23). - P. 5975-5979.]. Ці методи базуються на фізіологічній ролі білків і їх мутантних формах, які властиві пухлинним тканинам, та не властиві нормальним тканинам. Експресія описаних вище маркерів не є 100 % свідомством підвищеної метастатичної агресивності раку, можливі хибно-позитивні та хибно-негативні результати.

Відомі праймери для визначення рівня експресії CXCR4: forward 5'-TGACGGACAAGTACAGGCTGC-3', reverse 5'-CCAGAAGGGAAGCGTGATGA-3' та певні параметри методики [Sun YX1, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. J Cell Biochem. - 2003. Jun 1; 89(3):462-73. University of Michigan School of Medicine, 1500 E. Medical Center Drive, Ann Arbor, Michigan]. Здебільшого даний прайм ер використовують в дослідницькій роботі.

В основу запропонованої корисної моделі поставлено задачу створення такого способу визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР, який би дозволив уточнити первинний клінічний діагноз, та дозволив уникнути можливих хибно-позитивних або хибно-негативних результатів, а в залежності від того, чи пухлина метастатично агресивна, чи ні, дати онкологу можливість вибрати або жорстку, зі шкідливими побічними ефектами або менш жорстку, менш шкідливу тактику лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР, відповідно до корисної моделі, з зразка сечі хворого, отриманого після масажу простати, виділяють ДНК, виділяють РНК та синтезують до неї кДНК, проводять двоетапну кількісну ПЛР з використанням специфічних праймерів на першому етапі - *t_erg*-

2F - AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG, *t_erg*-1R - TCTGGAAGGCCATATTCTTTCAC на другому етапі - *t_erg*-2F - AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG, *t_erg*-2R - TAACTCTGCGCTCGTTCGTG до маркера-1 - кДНК гена *tmprss2/erg*, проводять метил-

специфічну ПЛР з використанням специфічних праймерів GSTP1F 5'-GATTTGGGAAAG AGGGAAAGG-3', GSTP1R 5'-CTAAAACTCTAAACCCCATCC-3', позитивний

контроль: F 5'-GGTAAAGATAAAATAGGAGATGTGT-3, R 5'-CCCTACCAAAAACAACCTAAAAAC-3' до маркера-2 - ДНК гена GSTP1, проводять кількісну ПЛР з використанням специфічних праймерів CXCR4F 5'-GGCCCTCAAGACCACAGTCA3', CXCR4R 5'-TTAGCTGGAGTGAAAACCTGAAG3'

позитивний контроль: la bcr f - AAATGTTGGAGATCTGCCTGAAG, lb bcr f - TTATCAAAGGAGCAGGGAAGAAG, P190-R - TTGACTGGCGTGATGTAGTTGC до маркера-3 - кДНК гена CXCR4, проводять електрофорез в агарозному гелі, за результатами електрофорезу в разі наявності смуг ампліфікату в гелях всіх трьох маркерів роблять висновок про високу метастатичну агресивність раку передміхурової залози, в разі, коли відсутні смуги ампліфікату в гелях всіх трьох маркерів, роблять висновок про низьку метастатичну агресивність раку передміхурової залози, в разі, коли присутні смуги ампліфікату лише одного або двох із цих трьох маркерів, залишають первинний діагноз без змін.

Запропоновані авторами праймери надійні в використанні та при їх одночасному використанні отриманий результат дозволяє робити висновок про наявність або відсутність метастатичної агресивності раку передміхурової залози.

Таблиця

Праймери для визначення наявності біохімічних Маркерів: експресії кДНК гена *tmprss2/erg*, кДНК гену *CXCR4* та наявності метилування гена ДНК *GSTP1*.

Маркери	Послідовність нуклеотидів праймерів для визначення експресії кожного з маркерів і позитивного контролю.		Довжина фрагменту після ампліфікації
Маркер-1 кДНК гена tmprss2/erg	Етап 1	t_erg-2F — AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG	936 п.н
		t_erg-1R — TCTGGAAGGCCATATTCTTTCAC	
	Етап 2	t_erg-2F — AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG	1021 п.н.
		t_erg-2R — TAACTCTGCGCTCGTTTCGTG	
Маркер-2	GSTP1F 5'-GATTTGGGAAAG AGGGAAAGG-3' GSTP1R 5'-CTAAAACTCTAAACCCCATCC-3'		310 п.н.
ДНК гена GSTP1	Позитивний контроль: F 5'- GGTAAGATAAAATAGGAGATGTGT-3' R 5'- CCCTACCAAAAAACAAACTAAAAAC-3'		
Маркер-3 кДНК гена CXCR4	CXCR4F 5'GGCCCTCAAGACCACAGTCA3'		352п.н.
	CXCR4R 5'TTAGCTGGAGTGAAACTTGAAG3'		
Позитивний контроль	Ia bcr f — AAATGTTGGAGATCTGCCTGAAG		314 п.н.
	Ib bcr f — TTATCAAAGGAGCAGGGAAGAAG		305 п.н.
	P190-R — TTGACTGGCGTGATGTAGTTGC		

Виділення тотальної ДНК проводили за стандартним протоколом (безфенольний метод). Концентрація зразків ДНК вимірювалася на приладі Nanodrop 2000 (Termo Scientific, USA) та нормується до 800 нг/мкл. Проводилася бісульфітна конверсія геномних ДНК за допомогою стандартного Epic JET Bisulfite Conversion Kit (Termo Scientific, Литва), відповідно до протоколу [15].

Виділення РНК для визначення *tmprss2/erg* та *CXCR4* проводили за допомогою комерційних наборів для виділення РНК з крові, які забезпечують виділення 5-20 мкг тотальної РНК або за допомогою загальноприйнятого методу [Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction//Analyt. Biochem. - 1987. - 162. - P. 156-159].

ПЛР та 3Т-ПЛР проводили у реальному часі на ампліфікаторі BioRad cFx96 за програмою: стадія первинної денатурації 95 °C-12 хв. та 40 циклів зі стадією денатурації 95 °C-15 сек.; стадією відпалу 55 °C-30 сек. і стадією елонгації 72 °C-40 сек.

Для визначення стану метилування промоторної частини гена *GSTP1* проводилася метил-специфічна ПЛР (МС-ПЛР) бісульфітно модифікованої ДНК, для цього синтезувалися метил-специфічні праймери до неметильованої ділянки промотору гена *GSTP1*: 5'-GATTTGGGAAAGAGGGAAAGG-3' (прямий) та 5'-CTAAAAACTCTAAACCCCATCC-3' (зворотній), продуктом яких є амплікон за розміром 310 п.н. Контролем на МС-ПЛР слугував ген лужної фосфатази за використанням відповідних праймерів до неметильованої ділянки промотору:

5'-GGTAAGATAAAATAGGAGATGTGT-3' (прямий) та 5'-CCCTACCAAAAAACAAACTAAAAAC-3' (зворотній) з відповідним продуктом ампліфікації 175 п.н.

Результати ПЛР та 3Т-ПЛР аналізувалися за допомогою електрофорезу в 3 % агарозному гелі з ТАЕ буфером (40 мМ трис ацетат; 1 мМ ЕДТА; рН 7,6). Детекція продуктів МС-ПЛР проводилася за допомогою етидій бромідного розчину (EtBr 0,01мг/мл) з подальшим аналізом електрофореграм за допомогою денситометрії в програмі TotalLab v. 2.01.

Наявність Маркера-1, експресії злитого гена *tmprss2/erg*, свідчило про можливу активну метастатичну міграцію пухлинних клітин, що потребувало додаткового підтвердження. Наявність Маркера-2, експресії промоторної частини гена *GSTP1* в клітинах сечі, підтвердило

первинний діагноз про наявність уро-онкологічного процесу. Наявність Маркера 3, експресії гена CXCR4, підтвердило підвищену метастатичну агресивність раку передміхурової залози.

Запропонований спосіб визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР дозволив вирішити задачу щодо підвищення якості діагностики. Комплексна оцінка отриманих результатів дозволила уточнити початковий діагноз в аспекті, чи висока метастатична агресивність раку передміхурової залози, чи ні. Це дало можливість онкологу спланувати терапію так, що при відсутності метастатичної агресивності застосовували лише мінімальну гормональну та хіміотерапію, а в разі підвищеної метастатичної агресивності після оперативного втручання призначали більш дорожчу і небезпечну активну гормональну, хіміо-, променевою терапію та постійний післяопераційний моніторинг. А при відсутності всіх трьох маркерів ставився під сумнів первинний клінічний діагноз наявності раку передміхурової залози.

Приклади. 1. Пацієнт Р. Національного Інституту Раку (17.06.2013 р.). Госпіталізований з діагнозом: рак передміхурової залози, друга стадія. Застосовували запропонований спосіб визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР. Визначали метастатичну агресивність карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР, а саме: після масажу простати з зразку сечі хворого виділяли ДНК, виділяли РНК та синтезували до неї кДНК, проводили кількісну ПЛР. Після комплексного аналізу отриманого після масажу простати сечі виявлено наявність Маркера-2 - метилування промоторної частини гена GSTP1, виявлена відсутність Маркера-1 - перебудови *tmprss2/erg* та відсутність Маркера-3 - експресії гена CXCR4. За цими результатами пухлина не має підвищеної метастатичної агресивності, що прийнято до уваги в виборі тактики лікування.

2. Пацієнт Н. Національного Інституту Раку (25.06.2013 р.). Госпіталізований з діагнозом: рак передміхурової залози, друга стадія. Застосовували запропонований спосіб визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР. Після комплексного аналізу отриманої після масажу простати сечі виявлено наявність Маркера-2 - метилування промоторної частини гена GSTP1, виявлений маркер-1 - наявність перебудови *tmprss2/erg* та наявність Маркера-3 - експресії гена CXCR4. Пухлина має підвищену метастатичну агресивність, що стало підставою для вибору відповідної тактики лікування.

3. Пацієнт П. Національного Інституту Раку (14.03.2014 р.). Госпіталізований з діагнозом: підозра на рак передміхурової залози, перша стадія. Застосовували спосіб визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР. Після комплексного аналізу отриманої після масажу простати сечі виявлено відсутність метилування промоторної частини гена GSTP1, виявлена відсутність перебудови *tmprss2/erg* та відсутність експресії гена CXCR4. У пацієнта були відсутні всі три Маркери раку передміхурової залози, що стало підставою для подальшого уточнення первинного діагнозу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення ступеня метастатичної агресивності карциноми передміхурової залози за допомогою специфічних праймерів ПЛР, який **відрізняється** тим, що з зразка сечі хворого, отриманого після масажу простати, виділяють ДНК, виділяють РНК та синтезують до неї кДНК, проводять двоетапну кількісну ПЛР з використанням специфічних праймерів на першому етапі - *t_erg-2F* - *AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG*, *t_erg-1R* - *TCTGGAAGGCCATATTCTTTCAC* на другому етапі - *t_erg-2F* - *AGTAGGCGCGAGCTAAGCAG*, *t_erg-2R* - *TAACCTCTGCGCTCGTTCTGTG* до маркера-1 - кДНК гена *tmprss2/erg*, проводять метил-специфічну ПЛР з використанням специфічних праймерів *GSTP1F* *5'-GATTTGGGAAAG AGGGAAAGG-3'*, *GSTP1R* *5'-CTAAAACTCTAAACCCCATCC-3'*, позитивний контроль: *F* *5'-GGTAAAGATAAAATAGGAGATGTGT-3'*, *R* *5'-CCCTACCAAAAACAAAATAAAAAAC-3'* до маркера-2 - ДНК гена *GSTP1*, проводять кількісну ПЛР з використанням специфічних праймерів *CXCR4F* *5'GGCCCTCAAGACCACAGTCA3'*, *CXCR4R* *5'TTAGCTGGAGTGAAAACCTTGAAG3'*, позитивний контроль: *la bcr f* - *AAATGTTGGAGATCTGCCTGAAG*, *lb bcr f* - *TTATCAAAGGAGCAGGGAAGAAG*, *P190-R* - *TTGACTGGCGTGATGTAGTTGC* до маркера-3 - кДНК гена CXCR4, проводять

- 5 електрофорез в агарозному гелі, за результатами електрофорезу в разі наявності смуг ампліфікату в гелях всіх трьох маркерів роблять висновок про високу метастатичну агресивність раку передміхурової залози, в разі, коли відсутні смуги ампліфікату в гелях всіх трьох маркерів, роблять висновок про низьку метастатичну агресивність раку передміхурової залози, в разі, коли присутні смуги ампліфікату лише одного, або двох із цих трьох маркерів, залишають первинний діагноз без змін.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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