



УКРАЇНА

(19) UA (11) 13616 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 31/727
A61B 17/94
G01N 33/49
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ РАНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

1

(21) u200508943

(22) 21.09.2005

(24) 17.04.2006

(46) 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.

(72) Швачко Людмила Павлівна, Бух Інна Георгіївна, Степаненко Аркадій Павлович, Процик Володимир Семенович, Кікоть Володимир Онуфрійович, Климнюк Григорій Іванович, Гульчій Микола Васильович

(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ ОНКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, Швачко Людмила Павлівна, Бух Інна Георгіївна, Степаненко Аркадій Павлович, Процик Володимир Семенович, Кікоть Володимир Онуфрійович, Климнюк Григорій Іванович, Гульчій Микола Васильович

2

(57) Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин, що включає дослідження соматичних клітин крові, за результатами якого діагностують злоякісну пухлину, який **відрізняється** тим, що під час дослідження соматичних клітин крові виконують молекулярно-генетичну експертизу стану ДНК-метилування, а саме, попередньо проводять відділення лімфоцитів від еритроцитарної маси, отримують геномну ДНК з ядерних клітин-лімфоцитів, яку потім гідролізують метилспецифічним ферментом ендонукліазної рестрикції, за результатами гідролізу визначають стан профілю ДНК-гіпометилування геному, а на основі стану ДНК-гіпометилування у порівнянні з відсутністю або майже відсутністю ДНК-гіпометилування геномних ДНК здорових донорів встановлюють або не встановлюють онкологічну прогресію.

Пропонована корисна модель відноситься до медицини, зокрема до онкології. Вона може бути застосована для ранньої діагностики онкологічного захворювання.

Відомий спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин, відповідно до якого шкіру хворого сканують парюю когерентних відбитих променів і визначають зони анізотропії, за якою діагностують злоякісну пухлину [Патент України №17968, МПК 6 A61B5/00; A61N39/00. Опубл. 31.10.1997. Бюл. №5].

Описаний спосіб може бути застосований у практиці профілактичних оглядів, може дати інформацію для подальших досліджень хворого, але не дає можливості поставити остаточний діагноз, через наявність, наприклад, на шкірі хворого забруднень, звичайного або незвичайного загару (від електричної дуги), мутацій шкіри і т.ін. Тому згаданий спосіб може бути використаний лише для відбору пацієнтів для подальших досліджень. До того ж, коли результат дії злоякісної пухлини вже вийшов на шкіру, остання достатньо розвинена в

організмі і для лікування пацієнта треба залучити досить значні засоби, наприклад хіміотерапію. Тобто, описану діагностику важко назвати ранньою.

Також відомий спосіб ранньої діагностики онкологічного захворювання, який включає дослідження стану ДНК метилування на пухлинах та пухлинних клітинних лініях, а за результатами згаданого дослідження встановлюють або не встановлюють онкологічну прогресію [Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. Ehrlich M., Jiang G., Fiala E., Dome JS., Yu MC., Long TL., JonnB., Sohn OS., Widschwendter M., Tomlinson GE., Chintagumpala M., Champagne M., Parham D, Liang G., Malik, Laird PW. //Oncogene - 2002, v.21, No43, p.694-702].

В описі даного способу зазначається, що "ДНК гіпометилування інколи має очевидне місце в ранньому канцерогенезі, але воно також може асоціюватися з онкологічною прогресією" але при цьому не виявлений взаємозв'язок між рівнем геномного ДНК метилуванням та відносними варіа-

(13) U

(11) 13616

(19) UA

нтами геномного (патерн) та de novo ДНК метилтрансферазного гену, що зменшує достовірність ранньої діагностики онкологічного захворювання таким способом.

Також відомий спосіб ранньої діагностики онкологічного захворювання, який включає дослідження злоскісних та доброякісних пухлин колоректального раку. [Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. Jordi Fridola, Xavier Sole, Maria F., Pazi Victor Moreno, Manel Esteller, Gabriel Capella, Miguel A. Peinado. //Human Molecular Genetics -2005, v.14, No2, p.319-326]. У якості об'єкта дослідження під час застосування згаданого способу використовують пухлинні клітини, а не соматичні клітини лімфоцитів периферійної крові хворого, поза пухлиною.

В описі даного способу зазначається, що пухлинні клітини характеризуються генералізованим порушенням ДНК метилювання, включаючи загальне зниження в рівні 5-метилцитозину разом з регіональним гіперметилюванням, зокрема, CpG острівців промоторних ділянок багатьох онкосупресорних генів. Існування обох - ДНК гіпометилювання та ДНК гіперметилювання в пухлинних клітинах на прикладі колоректального раку "можливо, відображає відмінні біологічні та клінічні особливості пухлинної прогресії", не конкретизуючи їх та не вказуючи про можливий асоціативний зв'язок між гіперметилюванням та гіпометилюванням, лише зауважуючи на те, що у карциномах (злоскісна пухлина) має місце вищий рівень ДНК гіперметилювання чим у аденомах (доброякісна пухлина), але при цьому мають місце подібні рівні ДНК гіпометилювання. Тому спосіб має пріоритетним саме ДНК гіперметилювання, як генетичного маркера в діагностиці злоскісних пухлин. А отже, достовірність ранньої діагностики онкологічного захворювання за таким способом є недостатньою.

Найбільш близьким до пропонованого за досягнутим результатом є спосіб ранньої діагностики злоскісних пухлин, що включає дослідження соматичних клітин крові, за результатами якого виконують ранню діагностику злоскісної пухлини [Декларативний патент України на винахід №64533А, МПК 7 А61D5/00, G01N33/49, G01N33/48; опубл. 16.02.2004, Бюл. №2, 2004]. Об'єктом дослідження

у відповідності до описаного способу є соматичні клітини крові - ядерні лімфоцити периферійної крові, а не пухлини.

Недолік описаного способу полягає у невизначеності молекулярно-генетичних причин деконденсації центромерного/перичентримерного гетерохроматину при онкологічній прогресії на стадії мітотичних хромосом лімфоцитів, що знижує достовірність отриманих результатів.

У основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу створення такого способу ранньої діагностики злоскісних пухлин, який би був більш достовірним за рахунок створення умов для визначення молекулярно-генетичних причин деконденсації центромерного/перичентримерного гетерохроматину при онкологічній прогресії на стадії мітотичних хромосом лімфоцитів.

Пропонований, як і відомий спосіб ранньої діагностики злоскісних пухлин, включає дослідження соматичних клітин крові, за результатами якого діагностують злоскісну пухлину, а, відповідно до пропозиції, під час дослідження соматичних клітин крові виконують молекулярно-генетичну експертизу стану ДНК метилювання, а саме, попередньо проводять відділення лімфоцитів від еритроцитарної маси, отримують геномну ДНК з ядерних клітин-лімфоцитів, яку потім гідролізують метилспецифічним ферментом ендонуклеазної рестрикції, за результатами гідролізу визначають стан профілю ДНК-гіпометилювання геному, а на основі стану ДНК-гіпометилювання у порівнянні з відсутністю або майже відсутністю ДНК-гіпометилюванням геномних ДНК здорових донорів встановлюють або не встановлюють онкологічну прогресію.

Пропонований спосіб ранньої діагностики злоскісних пухлин встановлює кореляцію між ДНК гіпометилюванням як раннього маркера пухлинної прогресії та деконденсацією гетерохроматину на рівні мітотичних хромосом, що є також цитогенетичним маркером ранньої діагностики. Авторами пропонованого способу виявлено, що стан ДНК - гіпометилювання у хворих з онкологічною прогресією на рівні лімфоцитів крові не залежить від типу пухлинного захворювання та віку хворого, що є вірогідним генетичним маркером у ранній діагностиці онкозахворювань.

Таблиця

Відносне співвідношення рівня геномного ДНК-гіпометилювання у здорових донорів та у хворих з онкологічною прогресією

Здорові донори		Хворі на пухлинну прогресію		
n	M+m	n	M+m	P
112	34,2+4,0	136	141,7+5,6	0,001

Встановлено, (n=136, P 0,001) що на клітинах крові хворих, поза пухлиною, а саме ядерних лімфоцитах, можна з'ясувати та діагностувати пухлинний процес за станом ДНК-гіпометилювання.

Злоскісна пухлина має клональне соматичне походження та є наслідком тривалого специфічного захворювання геному, пізнання факторів етіології якого, на жаль, не ототожнюється з пізнанням самих механізмів канцерогенезу. Пошук специфіч-

них молекулярних маркерів поза пухлиною - на лімфоцитах крові, що корелюють з пухлинною прогресією, є вірогідний шлях до раннього прогнозування та діагностики онкозахворювань. З наявністю ж подібних маркерів в самих пухлинах та клітинних пухлинних лініях переконливо може пов'язуватись специфічність їх дії по відношенню до вірогідного механізму розвитку онкозахворювання.

За пропонуванням способом діагностики показано, що аномальне (аберантне) ДНК-метилування при канцерогенезі, а саме - глобальне геномне ДНК-гіпометилування на рівні лімфоцитів периферійної крові у хворих з різним типом онкозахворювань (Фіг.2), що асоціюється з глобальним деметилуванням ALU-ДНК сателітних повторів (Фіг.3), є достовірним молекулярним маркером пухлинної прогресії. В аналогах пропонуваного способу аномальне ДНК-метилування виявлено на самих пухлинах та пухлинних клітинних лініях і пов'язується, насамперед, з переважним гіперметилуванням CpG-острівців у 5'-промоторних ділянках онкосупресорних генів (альтернативного механізму інактивації експресії цих генів при онкологічній прогресії) [3], на рівні загального патерну ДНК-гіпометилування геному пухлин та пухлинних клітин. Тому, за даними авторів аналогів ДНК-гіперметилування CpG-промоторних ділянок генів надається перевага як молекулярному маркеру у діагностиці пухлин, як незалежному від ДНК-гіпометилування.

Пропонуваний спосіб діагностики, побудований на визначенні стану ДНК-гіпометилування на клітинах крові, що корелює з онкологічною прогресією, включає: а) отримання нативної геномної ДНК з лімфоцитів периферійної крові хворого (з 1-5мл) [1], б) електрофоретичний аналіз нативного препарату геномної ДНК у 0,8% агарозному гелі, в) подальше, чутливе до ДНК-гіпометилування, метил-специфічний Hpa II - ендонуклеазний рестрикції геномної ДНК, у продовж 16 годин при температурі 37°C та г) електрофоретичне розділення в 1% - агарозному гелі профілю Hpa II - метил-специфічної ДНК- рестрикції. В аналізуючу пробу, об'ємом 20мкл, з концентрацією ДНК 5-10мкг, додавали 20 одиниць активності Hpa II ферменту рестрикції, селективному до неметильованих CpG сайтів ДНК [2] та 2мкл 10-кратного буферу для Hpa II - рестрикції. За контрольну пробу мали геномну ДНК лімфоцитів здорового донора. Після завершення ендонуклеазної рестрикції реакцію зупиняли внесенням у кожну з проб по 1мкл 0,5% розчину ЕДТА для інгібування ферменту. Електрофоретичним розділенням в 1% агарозному гелі аналізували появу специфічного профілю ДНК-гіпометилування після Hpa II-рестрикції геномної ДНК лімфоцитів у хворого з онкологічною прогресією, по відношенню до його відсутності, або майже відсутності у здорових донорів, що засвідчує про глобальний загальний стан ДНК-гіпометилування геному при онкологічній прогресії. В нормі в геномі людини має місце глобальне (майже на 95%) епігенетичне (постреплікаційне) ДНК-метилування, що асоціюється з транскрипційним "мовчанням" геному, за виключенням (до 10%) неметильованих CpG-острівців у 5'-промоторних ділянках транскрипційно активних генів [3], що робить геномну ДНК здорових донорів майже недоступною дії специфічному до ДНК - деметилування Hpa II ферменту ендонуклеазної

рестрикції, а отже профіль ДНК-гіпометилування є принциповим молекулярним маркером в ранній діагностиці пухлинної прогресії на рівні геномної ДНК лімфоцитів крові, поза пухлиною та до її появи.

Основним методом діагностики ДНК-гіпо- та гіперметилування по відомим, описаних вище способом ["Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors." Ehrlich M., Jiang G., Fiala E., Dome JS., Yu MC., Long TL., JonnB., Sohn OS., Widschwendter M., Tomlinson GE., Chintagumpala M., Champague M., Parham D., Liang G., Malik, Laird PW. //Oncogene -2002, v.21, No43, p.694-702. "Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer." Jordi Fridola, Xavier Sole, Maria F., Pazi Victor Moreno, Manel Esteller, Gabriel Capella, Miguel A. Peinado. //Human Molecular Genetics -2005, v.14, No2, p.319-326] є метил-специфічна ампліфікація, яка включає такі операції:

- виділення ДНК з пухлини,
- двостадійна послідовна рестрикція ДНК SmaI (специфічна до неметильованих залишків цитозину, на протязі 6год.) та XmaI (ізошизомер, метил-специфічна ендонуклеаза, на протязі 16год.)

Преципітація ДНК фрагментів етанолом.

Адапторне лігування ДНК фрагментів за допомогою адапторного праймеру.

ПЦР - ампліфікація такої пострестрикційно-лігуючої ДНК зі специфічними метилчутливими праймерами.

Електрофоретичний аналіз профілю метил-специфічної ампліфікації.

1. Суттєвого значення в діагностиці ДНК-метилування за відомими способами ["Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors." Ehrlich M., Jiang G., Fiala E., Dome JS., Yu MC., Long TL., Jonn B., Sohn OS., Widschwendter M., Tomlinson GE., Chintagumpala M., Champague M., Parham D., Liang G., Malik, Laird PW. //Oncogene -2002, v.21, No43, p.694-702. "Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer." Jordi Fridola, Xavier Sole, Maria F., Pazi Victor Moreno, Manel Esteller, Gabriel Capella, Miguel A. Peinado. //Human Molecular Genetics -2005, v.14, No2, p.319-326] має збереження нативної послідовності пострестрикційно-лігуючої ДНК для метил-специфічної ПЦР-ампліфікації.

2. Діагностична достовірність геномного патерну ДНК-гіпометилування як специфічного маркера для ранньої діагностики онкозахворювань лежить насамперед у площині процентного співвідношення геномного ДНК метилування (на 80-90%) та долі неметильованих CpG-острівців у складі промоторних ділянок генів (10-20%).

3. Тому, виходячи з пункту 2, показано, що на рівні лімфоцитів периферійної крові, поза пухлиною, саме ДНК-гіпометилування має важливе значення в пріоритеті ранньої діагностики та прогнозуванні онкозахворювань.

Таблиця

Кореляція між геномним (патерн) ДНК-гіпометилуванням та деконденсацією перицентромерного/центромерного гетерохроматину метафазних хромосом лімфоцитів крові у хворих з онкологічною прогресією

ДНК-гіпометилування		Деконденсація гетерохроматину		
n	%	n	%	P
136	100	500 метафаз	100	0,001

Суть пропонованого способу пояснюється за допомогою графічних матеріалів.

На Фіг.1 показано стан ДНК гіпометилування при пухлинній прогресії на основі Нра II-чутливої до неметильованих CpG сайтів ендонуклеазної рестрикції - контроль, при цьому числами 1-9 позначені геномні ДНК здорових донорів.

На Фіг.2 показано стан ДНК гіпометилування при пухлинній прогресії на основі Нра II-чутливої до неметильованих CpG сайтів ендонуклеазної рестрикції - пухлинна прогресія, при цьому:

- числом 1 позначено контроль ДНК фага λ ;
- числом 2 позначено ембріональна ДНК;
- числами 3-6 позначено геномні ДНК хворих;
- числом 3 позначено рак щитовидної залози;
- числом 4 позначено колоректальний рак;
- числом 5 позначено нейробластома;
- числом 6 позначено пухлина Вільмса.

На Фіг.3 показано молекулярна гібридизація DIG - (Alu) сателітних ДНК повторів з профілем ДНК-гіпометилування при пухлинній прогресії, при цьому:

1 - ДНК лімфоцитів здорового донора після Нра II рестрикції, специфічної до неметильованих залишків цитозину у складі CCGG послідовностей ДНК (2),

2 - ембріональна ДНК після Нра II рестрикції;

3 - ембріональна ДНК до рестрикції;

4 - ДНК лімфоцитів хворого на колоректальний рак після Нра II рестрикції;

5 - ДНК лімфоцитів хворого на колоректальний рак до рестрикції.

Приклад 1

Хвора, П., 22 років, пройшла лікування у Київському Центрі лікування та реабілітації хворих з патологією щитовидної залози. За експрес-діагностикою морфології тканини щитовидної залози, діагностикою УЗІ та клінічним обстеженням хвора мала заключний діагноз - медулярний рак з метастазуванням. У відповідності до пропонованого способу діагностики досліджували 5мл периферійної крові хворої. А саме, відділяли лімфоцити від еритроцитарної маси, отримували (безфенольним методом) геномну ДНК з ядерних клітин-лімфоцитів, яку потім гідролізували (на протязі 16год, при 37°) Нра II - специфічною до неметильованих CpG сайтів (було - у геномній ДНК, ендонуклеазою рестрикції та аналізували результати гідролізу ДНК за допомогою 0,7% агарозного гелю).

У складі CCGG послідовностей геномної ДНК, ендонуклеазою рестрикції та аналізували результати гідролізу ДНК за допомогою 0,7% агарозного гелю-електрофорезу. За результатами аналізу хвора мала специфічний профіль ДНК-

гіпометилування у порівнянні з донорською геномною ДНК, що корелює з онкологічною прогресією (Фіг.1).

Приклад 2

Хворий Федоров В.І., 54 років, пройшов лікування з хірургічним втручанням в Інституті онкології АМН України з верифікацією клінічного діагнозу на колоректальний рак.

У відповідності до пропонованого способу діагностики досліджували 5мл периферійної крові хворого. А саме, відділяли лімфоцити від еритроцитарної маси, отримували (безфенольним методом) геномну ДНК з ядерних клітин-лімфоцитів, яку потім гідролізували (на протязі 16год, при 37°) Нра II - специфічних до неметильованих цитозинових CpG сайтів у геномній ДНК, ендонуклеазою рестрикції та аналізували результати гідролізу ДНК за допомогою 0,7% агарозного гелю-електрофорезу.

За результатами аналізу стану метилування за метил-специфічною ендонуклеазною рестрикцією геномної ДНК лімфоцитів крові хворого достовірно мав місце профіль ДНК-гіпометилування у порівнянні зі здоровими донорами, що корелює з онкологічною прогресією.

Приклад 3

Хворий Олексієнко О.В., 11 років, пройшов лікування з хірургічним втручанням в Інституті Онкології АМН України з визначенням клінічним діагнозом за результатами УЗІ діагностики та рентгеноскопії - пухлина Юнга.

У відповідності до пропонованого способу діагностики досліджували 5мл периферійної крові хворого. А саме, відділяли лімфоцити від еритроцитарної маси, отримували (безфенольним методом) геномну ДНК з ядерних клітин-лімфоцитів, яку потім гідролізували (на протязі 16год, при 37°) Нра II - специфічних до неметильованих цитозинових CpG сайтів у геномній ДНК, ендонуклеазою рестрикції та аналізували результати гідролізу ДНК за допомогою 0,7% агарозного гелю-електрофорезу.

За результатами аналізу генетичної діагностики ДНК-гіпометилування геному на ядерних клітинах крові хворого - лімфоцитах, за результатом специфічної рестрикції до неметильованих залишків цитозину у складі CpG динуклеотидів, як головних молекулярних мішеней метилування геному, мав місце стан ДНК-гіпометилування геному хворого за специфічним профілем електрофоретичного аналізу ДНК хворого після такої рестрикції в агарозному гелі у порівнянні з донорською геномною ДНК. Стан глобального ДНК-гіпометилування корелював з онкологічним захворюванням хворого.

Таким чином, стан ДНК-гіпометилування набуває значення специфічного генетичного маркера в ранній діагностиці пухлинних захворювань на клітинах крові, за яким можна діагностувати хворих з різним типом пухлинних захворювань та який не залежить від віку хворого.

Літературні джерела:

1. Анализ генома. Методы. /Под ред. К. Дейвиса. -М.: Мир, 1990. -246с. Выделение ДНК из культивируемых клеток и лимфоцитов. -с.68.

2. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. /Москва, "Мир", 1984. -487с.

3. Esteller et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. /Cancer Research -2001, v.61, p.3225-3229.

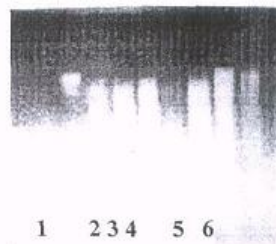
4. Деклараційний патент України на винахід №64533А, МПК 7 А61D5/00, G01N33/49, G01N33/48; опубл. 16.02.2004, Бюл. №2, 2004.

Контроль



1-9 - геномні ДНК здорових донорів

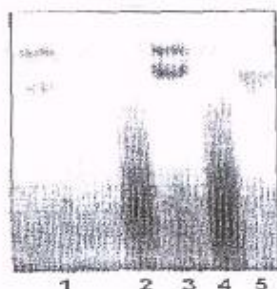
Пухлинна прогресія



- 1 - контроль - ДНК фага λ
- 2 - ембріональна ДНК
- 3 - 6-геномні ДНК хворих;
- 3 - рак щитовидної залози;
- 4 - колоректальний рак;
- 5 - нейробластома;
- 6 - пухлина Вільмса.

Фиг. 1

Фиг. 2



- 1 - ДНК лімфоцитів здорового донора після Hpa II рестрикції;
- 2 - ембріональна ДНК після Hpa II рестрикції;
- 3 - ембріональна ДНК до рестрикції;
- 4 - ДНК лімфоцитів хворого на колоректальний рак після Hpa II рестрикції;
- 5 - ДНК лімфоцитів хворого на колоректальний рак до Hpa II рестрикції;

Фиг. 3